



**Universidade de Aveiro** Departamento de Química  
2018

**Cláudia Perpétua  
Manique dos Santos**

**Estudo da produção de leveduras de cerveja para  
aplicação industrial.**





**Cláudia Perpétua  
Manique dos Santos**

**Estudo da produção de leveduras de cerveja para  
aplicação industrial**

dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química, realizada sob a orientação científica da Doutora Ana Maria Rebelo Barreto Xavier, Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e coorientação do Engenheiro Gonçalo Ribeiro Faustino, CEO da empresa Faustino Microcervejeira, Lda.



## **o júri**

**Presidente** Doutora Maria Inês Purcell de Portugal Branco  
Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutora Luísa Alexandra Seuanes Serafim Martins Leal  
Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutora Ana Maria Rebelo Barreto Xavier  
Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro



## palavras-chave

Cerveja artesanal, Produção de leveduras, Produção de Cerveja, *Saccharomyces cerevisiae*, SafAle™ US-05

## Resumo

A cerveja é das bebidas mais antigas do mundo e apesar da sua produção tradicional houve, ao longo dos anos um grande avanço tecnológico no seu processamento. Hoje em dia é produzida em grande escala em grandes indústrias cervejeiras, mas, por outro lado, cada vez mais é produzida artesanalmente de um modo mais tradicional. A produção de cerveja artesanal está em crescimento em Portugal e as cervejarias apontam para um crescimento das suas instalações, apostando também num avanço tecnológico. Uma das matérias-primas principais da cerveja são as leveduras e sendo estas microrganismos é possível propaga-las na própria empresa de produção de modo a ter um crescimento próprio e evitando a sua compra.

Este trabalho foi realizado em parceria com a empresa Faustino Microcervejeira, Lda com o objectivo de estudar o crescimento da levedura mais utilizada na fábrica, SafAle™ US-05 uma *Saccharomyces cerevisiae*. Deste modo, depois de se ter tomado conhecimento com a realidade industrial da empresa, fez-se um estudo em Laboratório, no Dep. de Química da Universidade de Aveiro, em condições de assepsia, incubando culturas em Erlenmeyer de 500 mL com um volume útil de 200 mL a uma temperatura de 28 °C com uma agitação orbital de 180 rpm. Estudaram-se dois meios de crescimento sintéticos, o meio YM, um meio mais rico e o meio MS, um meio mais simples, mas menos dispendioso. Os ensaios foram realizados nestes meios com uma concentração constante de glucose de 20 g/L. Posteriormente fizeram-se ensaios variando a concentração de inóculo, C=0,173 g/L e C=0,277 g/L. Por fim, foi estudado o efeito do oxigénio, através do fornecimento de um caudal de ar de 2 L/min

Os melhores resultados foram obtidos com meio YM pois proporcionou uma concentração de biomassa maior (2,15 g/L) e uma maior taxa específica de crescimento (0,224 h<sup>-1</sup>). A maior concentração de inóculo permitiu obter melhores resultados, 3,19 g/L de biomassa e taxa específica de crescimento de 0,288 h<sup>-1</sup>. A adição de ar permitiu obter maiores concentrações de biomassa, 4,21 g/L com C<sub>inóculo</sub>=0,173 g/L e 3,83 g/L com C<sub>inóculo</sub>=0,277 g/L, contudo a taxa específica de crescimento nestes ensaios foi inferior do que nos casos em que havia ausência deste caudal, tendo sido 0,163 h<sup>-1</sup> com C<sub>inóculo</sub>=0,173 g/L e 0,162 h<sup>-1</sup> com C<sub>inóculo</sub>=0,277 g/L. Concluiu-se que um caudal de ar para um fornecimento de oxigénio é benéfico pois a quantidade de biomassa final obtida foi superior. O facto de a taxa específica de crescimento ter sido inferior certamente poderá ser explicado pela existência da tensão de corte provocada pela entrada do caudal de ar, que teve um grande impacto nestes ensaios realizados em pequena escala. Sugere-se assim que o estudo possa prosseguir utilizando o meio YM com concentração de inóculo de 0,277 g/L, e estudando o melhor caudal de ar numa geometria maior, ou seja em bioreator.





## Keywords

Craft Beer, Yeast production, Beer production, *Saccharomyces cerevisiae*, *SafAle™ US-05*

## Abstract

Beer is one of the oldest drinks in the world and despite its traditional production there has been over the years a great technological advance in its processing. Nowadays it is produced on a large scale in large breweries but on the other hand there has been an increase on craft beer production taking beer production to a more traditional way. The production of craft beer is growing in Portugal and the breweries point to a growth of their facilities betting also on a technological advance. One of the main raw materials of beer is yeast and being a microorganism it is possible to propagate it in the own company of production in order to have its own growth and avoiding its purchase.

This study was carried out in partnership with the company Faustino Microcerveja, Lda with the aim of studying the growth of the most used yeast in the company: *SafAle™ US-05* a *Saccharomyces cerevisiae*. Thus, after becoming acquainted with the company's industrial reality a study was carried out in a laboratory at the Department of Chemistry of the University of Aveiro under aseptic conditions incubating cultures in 500 mL Erlenmeyers using a volume of 200 mL at a temperature of 28°C with an orbital shaking of 180 rpm. Two synthetic growth media were studied: YM medium (a richer medium) and the MS medium (a simpler but less expensive medium). Assays were performed in these media with a constant concentration of glucose of 20 g/L. Subsequently assays were performed varying the inoculum concentration:  $C=0,173$  g/L and  $C=0,277$  g/L. Finally, the effect of oxygen was studied by providing an air flow rate of 2 L/min.

Better results were obtained with the YM medium as it provided a higher concentration of biomass (2,15 g/L) and a higher specific growth rate ( $0,224\text{ h}^{-1}$ ). The highest concentrations of inoculum allowed better results: 3,19 g/L of biomass and a specific growth rate of  $0,288\text{ h}^{-1}$ . The addition of an air flow allowed to obtain higher biomass concentrations: 4,21 g/L with  $C_{\text{inoculum}}=0,173$  g/L and 3,83 g/L with  $C_{\text{inoculum}}=0,277$  g/L. However the specific growth rate was lower in these assays than in the absence of an air flow, being of  $0,163\text{ h}^{-1}$  for  $C_{\text{inoculum}}=0,173$  g/L and  $0,162\text{ h}^{-1}$  for  $C_{\text{inoculum}}=0,277$  g/L. It can be concluded that providing an air flow to supply oxygen to the fermentation is beneficial since the biomass concentrations obtained were higher. The fact that the specific growth rate was lower can certainly be explained by the existence of shear stress caused by the entrance of the air flow which had a great impact in these small-scale assays. It is therefore suggested that the study can be carried out using the YM medium with an inoculum concentration of 0,277 g/L and studying the best air flow in a larger geometry, a bioreactor.



# **Índice de Conteúdos**

1. Introdução: Contexto Geral e Objetivos .....	1
2. Revisão Bibliográfica.....	3
2.1. Produção de Cerveja .....	3
2.1.1. Breve História.....	3
2.1.2. Matérias-Primas .....	4
2.1.2.1. Malte.....	4
2.1.2.2. Água .....	7
2.1.2.3. Lúpulo.....	8
2.1.2.4. Leveduras.....	9
2.1.3. Processo de Produção de Cerveja.....	11
2.2. Metabolismos de leveduras .....	13
2.2.1. Meios de Cultura .....	15
2.2.2. Isolamento de Culturas Puras .....	15
2.2.3. Crescimento Microbiano .....	16
2.2.4. Curva de Crescimento .....	16
2.2.5. Taxa específica de crescimento .....	18
2.2.6. Biorreatores .....	18
3. Materiais e Métodos.....	21
3.1. Esterilização e Assepsia .....	21
3.2. Meios de Cultura .....	21
3.3. Microrganismo e Manutenção.....	22
3.4. Criotubos .....	22
3.5. Fermentações.....	23
3.5.1. Pré-Inóculos e Inóculos .....	23
3.5.1.1. Ensaio em Erlenmeyer .....	23
3.6. Métodos Analíticos .....	24
3.6.1. Determinação do Peso Seco .....	24
3.6.2. Quantificação de Biomassa .....	24
3.6.3. CFU's.....	25
3.6.4. Medição de pH.....	25

3.6.5. Quantificação de Açúcares Redutores .....	25
3.7. Cálculos.....	27
3.7.1. Parâmetros Cinéticos e Estequiométricos.....	27
3.7.2. Taxas de evaporação.....	27
4. Resultados e Discussão .....	29
4.1. Produção de Cerveja na Fábrica.....	29
4.2. Ensaios em Erlenmeyer.....	36
4.2.1. Curva de Calibração (Peso Seco) .....	36
4.2.2. Comparação de meios sintéticos.....	38
4.2.3. Influência da Concentração Inicial de Inóculo .....	42
4.2.4. Influência do Arejamento .....	45
5. Conclusões .....	59
6. Bibliografia .....	61

## Índice de Figuras

<b>Figura 2.1</b> – Exemplo de curva de crescimento .....	17
<b>Figura 4.1</b> - Processo de recirculação para o tanque .....	31
<b>Figura 4.2</b> – Grãos do filtrado recolhidos para ração animal .....	32
<b>Figura 4.3</b> – Fermentadores de cerveja. ....	35
<b>Figura 4.4</b> – Processo de engarrafamento da cerveja. ....	36
<b>Figura 4.5</b> – Engarrafamento de cerveja em barril.....	36
<b>Figura 4.6</b> – Curva de calibração biomassa vs tempo para o meio MS.....	37
<b>Figura 4.7</b> – Curva de calibração biomassa vs tempo para o meio YM.....	38
<b>Figura 4.8</b> – Comparação da concentração de biomassa vs tempo no meio MS e no meio YM e monitorização da concentração de glucose e do pH durante a fermentação.....	39
<b>Figura 4.9</b> – Representação logarítmica da biomassa (g/L) vs tempo para o meio MS e para o meio YM .....	41
<b>Figura 4.10</b> - Comparação da concentração de biomassa vs tempo para uma concentração de inóculo de 0,173 g/L e de 0,277 g/L e monitorização do pH durante a fermentação.....	43
<b>Figura 4.11</b> – Representação logarítmica da biomassa vs tempo para uma concentração de inóculo de 0,173 g/L e 0,277 g/L .....	44
<b>Figura 4.12</b> – Estudo do efeito da adição de um caudal de ar de 2 L/min na biomassa durante a fermentação e monitorização do pH. ....	46
<b>Figura 4.13</b> – Representação logarítmica da biomassa vs tempo comparando a influência da adição de um caudal de ar de 2 L/min. ....	47
<b>Figura 4.14</b> – Estudo da influência da adição de um caudal de ar de 2 L/min na fermentação e a sua reprodutibilidade.....	48
<b>Figura 4.15</b> – Representação logarítmica da biomassa vs tempo das réplicas dos para o estudo da influência da adição de um caudal de ar de 2 L/min. ....	49
<b>Figura 4.16</b> – Efeito da evaporação causada pela adição de um caudal de ar de 2 L/min. ....	52

<b>Figura 4.17</b> – Representação logarítmica da biomassa vs tempo para os ensaios realizados com a adição de um caudal de ar e as suas correções com as taxas de evaporação calculadas. Cálculo das taxas específicas de crescimento.....	53
<b>Figura 4.18.</b> – Comparação das curvas de crescimento para $C_{inóculo}=0,173$ g/L e $C_{inóculo}=0,277$ g/L com e sem a adição de um caudal de ar de 2 L/min.....	55
<b>Figura 4.19</b> – Representação logarítmica dos perfis de biomassa vs tempo para $C_{inóculo}=0,173$ g/L e $C_{inóculo}=0,277$ g/L com e sem a adição de um caudal de ar de 2 L/min. Representação das respetivas correções das taxas de evaporação calculadas. ....	56

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 4.1</b> – Comparação dos parâmetros cinéticos e estequiométricos nos meios MS e YM .....	41
<b>Tabela 4.2</b> – Comparação dos parâmetros cinéticos para uma concentração de inóculo de 0,173 g/L e de 0,277 g/L.....	44
<b>Tabela 4.3</b> - Comparação dos parâmetros cinéticos sob a influência da adição de um caudal de ar.....	47
<b>Tabela 4.4</b> – Comparação dos parâmetros cinéticos sob a influência da adição de um caudal de ar de 2 L/min e a sua reprodutibilidade.....	49
<b>Tabela 4.5</b> – Comparação dos volumes de fermentação e taxas de evaporação calculadas. ....	51
<b>Tabela 4.6</b> – Efeito da evaporação causada pela adição de um caudal de ar nos parâmetros cinéticos .....	54
<b>Tabela 4.7</b> – Comparação dos parâmetros cinéticos dos ensaios com diferentes concentrações de inóculo, com e sem arejamento e as suas correções com as taxas de evaporação calculadas.....	57





## Abreviaturas

<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>C<sub>inóculo</sub></b>	Concentração de inóculo (g/L)
<b>C<sub>biomassa</sub></b>	Concentração de biomassa (g/L)
<b>CFU</b>	Unidades formadoras de colónias (nº de células viáveis/mL)
<b>DNS</b>	Ácido 3,5-dinitrossalicílico
<b>D.O.</b>	Densidade ótica
<b>D.O.<sub>inicial</sub></b>	Densidade ótica inicial
<b>MS</b>	Meio sintético de sais
<b>P<sub>x</sub></b>	Produtividade da biomassa (g·L <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> )
<b>S<sub>c</sub></b>	Substrato consumido (g/L)
<b>T</b>	Tempo (h)
<b>T</b>	Temperatura (°C)
<b>V</b>	Volume (L)
<b>YM</b>	Meio sintético <i>Yeast Mold</i>
<b>Y<sub>xSc</sub></b>	Rendimento (g·g <sup>-1</sup> )
<b>μ</b>	Taxa específica de crescimento (h <sup>-1</sup> )
<b>μ<sub>máx</sub></b>	Taxa específica de crescimento máxima (h <sup>-1</sup> )
<b>X<sub>0</sub></b>	Concentração celular no início da fase exponencial (g/L)
<b>X<sub>t</sub></b>	Concentração celular ao longo do tempo (g/L)



# **1. Introdução: Contexto Geral e Objetivos**

A cerveja é uma das bebidas mais antigas no mundo e ao longo dos anos o processo de produção da cerveja teve um grande avanço tecnológico, sendo hoje em dia produzida em grande escala em grandes indústrias. Mesmo implementando este avanço tecnológico, hoje em dia a cerveja é, cada vez mais, produzida de forma artesanal. A produção de cerveja artesanal está em crescimento em Portugal, sendo que as cervejarias artesanais apontam para o crescimento das suas instalações e apostam também no avanço tecnológico atual.

Uma das matérias-primas principais no processo de produção de cerveja são as leveduras. Estas tratam-se de microrganismos e assim sendo, é possível cultiva-las e propaga-las de forma autónoma. Conseguindo fazer o crescimento próprio das leveduras é possível evitar a sua constante compra, sendo isto uma mais valia para uma empresa.

Este trabalho realizou-se em parceria com a empresa Faustino Microcervejeira, Lda com o objetivo de estudar o crescimento da levedura mais utilizada na produção da fábrica, uma *Saccharomyces cerevisiae*, o produto comercial *SafAle™ US-05*. Deste modo, depois de se ter tomado conhecimento com a realidade industrial da empresa em questão, foi feito um estudo em laboratório, no Departamento de Química da Universidade de Aveiro. Este estudo foi realizado em condições de assepsia, incubando culturas em Erlenmeyer de 500 mL, utilizando um volume útil de 200 mL a uma temperatura de 28°C e com uma agitação orbital de 180 rpm. Foram estudados dois meios de crescimento sintéticos diferentes: o meio YM, um meio mais rico, mas mais dispendioso e o meio MS um meio menos dispendioso, mas mais simples. Foram também estudadas duas concentrações de inóculo diferentes  $C_{\text{inóculo}} = 0,173 \text{ g/L}$  e  $C_{\text{inóculo}} = 0,277 \text{ g/L}$  e no final foi também estudado o efeito do oxigénio durante a fermentação, fornecendo um caudal de ar de 2 L/min.



## **2. Revisão Bibliográfica**

### **2.1. Produção de Cerveja**

#### **2.1.1. Breve História**

A cerveja é uma das bebidas mais antigas do mundo [1], [2]. Existem indícios de que a produção desta bebida fermentada se iniciou há milhares de anos atrás. Apesar do enorme crescimento tecnológico que separa as cervejarias antigas das cervejarias de alta tecnologia de hoje em dia, o processo permanece inalterado na sua versão tradicional, sendo cada vez mais comum a sua produção artesanal. No entanto, mesmo sendo capazes de produzir cervejas primitivas, os nossos ancestrais não possuíam quaisquer conhecimentos das etapas bioquímicas envolvidas neste processo [2].

Alguns historiadores sugeriram a existência de bebidas semelhantes a cerveja na China 7000 aC, mas os primeiros registos escritos relativamente ao consumo de cerveja são apenas datados a 2800 aC na Mesopotâmia. No entanto, existem fortes evidências de que a cerveja nasceu por volta de 9000 aC durante a revolução Neolítica, quando a humanidade iniciou uma vida mais estável, deixando o nomadismo e havendo necessidade de cultivo e armazenamento de grãos de cereais [2].

Da Mesopotâmia a cultura da cerveja foi espalhada pelo Egito tendo sido a sua bebida de eleição até 30 aC. Depois do Egito cair sobre o domínio romano o vinho passou a ser a bebida predileta na região, apesar de que a cerveja continuou uma bebida muito popular. Nessa altura o vinho era considerado a bebida da classe alta e a cerveja apenas voltou a ter protagonismo depois dos romanos terem perdido o domínio da Europa Ocidental no século V dC para os alemães. Assim a produção de cerveja continuou pela Europa até aos dias de hoje [2], [3].

Apesar da contínua competição que a cerveja enfrenta contra o vinho, tem havido um crescimento da produção de cerveja nos últimos

anos e as previsões são de uma continuação de crescimento da mesma. O volume de produção da cerveja duplicou desde 1970 até 2003 e ao mesmo tempo que a população mundial aumentou 59 % [3].

A cerveja é uma bebida obtida por fermentação alcoólica do mosto de cervejeiro proveniente do malte de cevada e da água adicionada por ação das leveduras, com adição de lúpulo. Esta última matéria-prima, o lúpulo, apenas começou a ser adicionado à produção de cerveja no ano 1000 por possuir propriedades antissépticas e preservar assim a cerveja e o seu sabor por mais tempo. Apenas no final do século XX se conseguiu fabricar cerveja com segurança microbiológica e com todas as suas características organolépticas atualmente conhecidas, tanto a nível de paladar, cor, como de olfato, corpo e aroma. Este avanço na produção de cerveja foi consequência das descobertas de Louis Pasteur que tiveram um grande impacto na produção de alimentos devido à esterilização de materiais e ao processo de pasteurização de alimentos. Com este aumento de qualidade de produção, foi possível garantir um maior tempo de prateleira deste produto, sendo assim expandida a sua comercialização. No início do século XX já existiam mais de 3200 cervejarias apenas na Bélgica. Atualmente a maior produtora de cerveja é a Europa, seguida dos Estados Unidos, Japão e Brasil. Para além de ser a maior produtora, a Europa é também a maior consumidora deste produto relativamente aos outros continentes, onde por comparação o seu consumo é considerado baixo [1].

## **2.1.2. Matérias-Primas**

### **2.1.2.1. Malte**

O malte trata-se de qualquer grão que tenha passado pelo processo de maltagem que é um processo que leva à pré-germinação dos grãos.

A cevada (*Hordeum vulgare*) é o principal cereal usado na produção de malte, sendo este cereal utilizado em 90% da produção global de cerveja. Na cevada, assim como noutros cereais, o açúcar está contido dentro dos grãos em forma de amido, um polissacárido não fermentável. Este não pode ser convertido pelas leveduras durante a fermentação, ou seja, estas não podem utilizar este açúcar complexo como substrato. Os cereais utilizados na produção de cerveja têm portanto que passar previamente por um processo de maltagem de forma a produzir as enzimas necessárias para hidrolisar ou modificar a matriz de proteína-glucana que rodeia o amido [4].

A maltagem consiste na germinação dos grãos de modo a desencadear transformações naturais no desenvolvimento da planta e é feita a sua paragem quando os grãos atingem as características pretendidas, ou seja quando se torna possível utilizar os açúcares neles contidos [2], [4]–[6]. Inicialmente, os grãos são hidratados de modo a que a sua taxa de humidade passe dos 15% para os 45% para que possam germinar [1], [5], [6]. Este primeiro processo, denominado de maceração pode ser feito por imersão, sendo a semente colocada dentro de água em alternância com períodos a descoberto. Neste caso, quando imersa, a semente é mexida e oxigenada com ar comprimido e quando descoberta o ar é constantemente renovado, de modo a evacuar o CO<sub>2</sub> e o calor produzidos para que a semente obtenha o oxigénio necessário à sua respiração. Esta hidratação pode ser feita também por aspersão, sendo fornecida uma grande irrigação à semente, juntamente com uma grande renovação do ar, permitindo que esta humidifique. Esta primeira fase tem uma duração de entre 30h a 45h e no final é possível observar o rebento e as raízes dos grãos [6]. Ao ser humedecido, o rebento vai sofrer importantes alterações bioquímicas que passam pela sua ativação enzimática e que vão hidrolisar as reservas de amido e proteínas para formar uma nova planta. Este é o papel crucial da maltagem: o enriquecimento do malte com enzimas (amilolíticas, proteolíticas,...), modificação do endosperma e formação de compostos aromáticos. As

enzimas que degradam o amido como a  $\alpha$ -amilase,  $\beta$ -amilase,  $\alpha$ -glucosidase e dextrinase são produzidas durante a germinação e são necessárias para a hidrólise dos polissacáridos, ao contrário das proteolíticas [2]. Esta fase de germinação tem uma duração de entre 3 a 6 dias em que os grãos são continuamente ventilados por ar condicionado na temperatura e humidade necessária de modo a permitir a sua respiração e toda esta atividade enzimática [6]. A fase ideal para interromper a germinação é quando o malte está rico em enzimas, conseguiu suficiente modificação do endosperma e consumiu o mínimo possível de materiais de reserva como o amido e proteínas durante o desenvolvimento do embrião [2], [4]. Neste ponto a germinação é então interrompida pela secagem. É nesta etapa que existem várias transformações que conferem ao malte as propriedades enzimáticas necessárias para o processo e que este adquire todos os compostos que lhe vão permitir obter todos os aromas e sabores pretendidos na cerveja produzida. Se as reações bioquímicas são aceleradas nas primeiras fases, com a diminuição da humidade vão ser paradas quaisquer atividades enzimáticas. Quando a taxa de humidade atinge um nível suficientemente baixo, a temperatura é aumentada durante algumas horas de modo a torrar o grão e eliminando todas as moléculas, que poderão dar origem a mau gosto no produto final em vez de produzirem os compostos aromáticos desejados. Após um arrefecimento final, o malte sai do secador com uma taxa de humidade de 4 a 4,5%, o que o permite conservar durante vários meses em boas condições. O malte mais comum é um malte pálido, conhecido por Pilsener, todas as restantes variedades de malte derivam deste ponto por meio cozimento em forno ou a diferentes temperaturas, podendo assim obter-se vários maltes que podem originar diferentes tipos de cervejas. No entanto, quanto mais o malte é tratado termicamente, maior será o dano feito nas enzimas. Assim,



enquanto que os maltes Pilsener são mais ricos em enzimas, o malte de chocolate (completamente torrado) não tem atividade enzimática. Estes maltes mais torrados são conhecidos por maltes especiais e na produção de cerveja são misturados com outros maltes, pois estes são utilizados para dar diferentes aromas, cores e corpo ao produto final e não tendo tanta atividade enzimática não é possível utilizá-los como substituto do de um malte Pilsener por completo. [1], [2], [4]–[7]. Todo este processo de transformação dos grãos de cereais em malte tem a duração de cerca de 8 dias [6].

#### **2.1.2.2. Água**

A água corresponde a uma grande percentagem do produto final e a sua influência na cerveja é um fator importante a ter em conta [1], [2], [4], [5].

Água de diferentes zonas ou países possui diferentes composições de sais e diferentes pH. Existem águas famosas pois devido às suas propriedades específicas dão origem a cervejas com paladares únicos. Isto poderia restringir a produção de cerveja em certas zonas, mas hoje em dia é possível utilizar a água da torneira como um ingrediente padronizado [4], [5]. A principal característica a ter em conta na água a ser utilizada é o seu pH, pois um pH demasiado alcalino poderá ocasionar a dissolução de matérias indesejáveis ao processo existentes no malte e nas películas dos grãos. O pH ideal para a produção de cerveja é de 5,2/5,3. Ao ser utilizada água da torneira, o mais provável será que esta contenha cloro, que é facilmente eliminado da água por evaporação fervendo-a. Com a filtração de carvão ativado, facilmente se consegue eliminar a maior parte dos odores ou sabores indesejados na água (cerca de 80-90%), como nitratos, por exemplo, deixando substâncias necessárias, como o magnésio e o cálcio na água a ser usada. Em alternativa também podem ser adicionados amaciadores de água que eliminam minerais com sabores indesejados, mas esta alternativa funciona melhor quando são usados extratos de malte em

vez dos grãos, pois o processo de moagem requer níveis mínimos de minerais como o cálcio e o magnésio que estes aditivos iriam eliminar que acabam por permanecer na cerveja depois da ebulição [1], [2], [4], [5], [7].

### 2.1.2.3. Lúpulo

Lúpulo é uma planta, uma flor, que pertence à ordem *Urticaceae*, da família *Cananbinaceae* e género *Humulus*, cujo nome científico é *Humulus lupulus* [4], [8], [9].

Os lúpulos são conservantes naturais e a sua adição no processo de produção de cerveja foi iniciada com esse intuito. Posteriormente a adição do lúpulo na cerveja tornou-se essencial ao produto final pois o seu efeito no sabor e aroma é indispensável para o que conhecemos como cerveja [1], [4], [5], [10], [11]. Esta planta também melhora a formação da espuma da cerveja e mantém-na estável [4], [8]. O lúpulo é constituído por um grande leque de espécies químicas como celulose, lenhinas, proteínas lípidos, resinas, óleos essenciais, polifenóis, ceras, aminoácidos e taninos [3], [4], [8]. Os componentes do lúpulo que são essenciais para o processamento de cerveja são os seus óleos essenciais, os polifenóis e as suas resinas que acabam por permanecer [4], [5], [8]–[10].

Os lúpulos podem ter 3 funcionalidades diferentes no processo: conferir o amargor, dar sabor ou aroma. No caso em que é usado para conferir o amargor à cerveja, este é adicionado no início da ebulição, para o sabor adiciona-se no meio da ebulição e, no caso de ser usado para conferir aroma é adicionado apenas no final da ebulição. Nesta fase ocorre a reação de isomerização do lúpulo que transforma os compostos menos solúveis (alfa-ácidos) em compostos mais solúveis (alfa-iso-ácidos). Estes ácidos é que conferem o amargor no sabor do produto, por isso, consoante o tempo da fervura em que são

adicionados, vão ter os seus diferentes impactos no produto final: quantos mais compostos alfa-iso-ácidos, maior a solubilidade e o amargor na mistura. Os óleos essenciais do lúpulo são os que conferem o aroma em si e estes vão sendo eliminados durante o processo de fervura. Assim para ter uma cerveja mais aromática o lúpulo é adicionado no final da ebulição para que os seus óleos essenciais não sejam eliminados[4], [5], [8], [10], [11]. Esta planta pode também ser adicionada posteriormente no fermentador, de modo a conferir mais aroma ao sabor final da cerveja, sendo este passo conhecido por *dry-hopping*. Como não há processo de ebulição após este ponto, o aroma vai ser conservado e conseguem-se melhores resultados no final da fermentação e no produto acabado [5].

#### **2.1.2.4. Leveduras**

Matérias-primas como o malte e o lúpulo são de grande importância no processo de produção de cervejas, mas estes podem ser em parte substituídos por outros componentes, enquanto que as leveduras não têm qualquer substituição na produção de uma cerveja. As leveduras utilizadas na produção de cerveja, são os microrganismos responsáveis pelo processo de fermentação da cerveja. Estas podem vir em solução ou em pó (leveduras liofilizadas) e podem ser de fermentação alta (para cervejas do tipo *ale*) ou de fermentação baixa (para cervejas do tipo *Lager*). Estes microrganismos consomem o açúcar extraído do malte e transformam-no em álcool e dióxido de carbono para que gaseifique a cerveja. Para além disso são formados outros compostos que não o álcool, na metabolização da cerveja que existem em quantidades muito reduzidas, mas que também têm peso no sabor e aroma do produto final [12].

A maior parte dos sabores e aromas da cerveja provêm de compostos que são, na sua maioria, produzidos na fase de fermentação e consistem em intermediários metabólicos ou produtos secundários das leveduras [12]. Os elementos principais produzidos pelas leveduras são

álcoois superiores, ésteres e dicetonas vicinais (VDKs) e são estes que determinam a qualidade final da cerveja produzida. Enquanto que os álcoois superiores e os ésteres são componentes voláteis desejáveis para uma cerveja de sabor agradável, as VDKs são frequentemente consideradas como sabores desagradáveis. Para além destes compostos o metabolismo das leveduras contribui com mais três grupos de compostos químicos: ácidos orgânicos, compostos de enxofre e aldeídos [12]. Todos os compostos de sabor ativo na cerveja devem de ser mantidos num determinado equilíbrio, qualquer componente ou grupo de componentes que se sobreponha aos demais pode ter demasiado ênfase, fazendo com que o sabor do produto final não seja o desejado [12].

Relativamente ao aroma, alguns dos compostos importantes formados são os ésteres que atribuem aromas frutados e doces. A espuma da cerveja é outra característica oriunda das leveduras pois esta está diretamente relacionada com a existência de dióxido de carbono na cerveja que é produzido pelas leveduras. Outra característica alterada pelas leveduras é a cor da cerveja que, apesar de a sua maior parte ser resultante do malte utilizado, sofre alteração durante a fermentação, ficando mais clara. Ao serem utilizados microrganismos é necessário um cuidado extra pois o mínimo descuido pode resultar em contaminação no produto em questão originando microrganismos indesejáveis e produzindo gostos que não são característicos nem desejáveis numa cerveja [5].

Os álcoois superiores são o tipo de composto que confere sabor e aroma mais abundante na cerveja. A levedura absorve os aminoácidos presentes no mosto dos quais retiram o grupo amino para que este possa ser incorporado na sua própria estrutura. O que resta do amino ácido entra numa reação em cadeia irreversível que forma um produto secundário: os álcoois superiores [12].

### **2.1.3. Processo de Produção de Cerveja**

A seleção das matérias-primas é muito importante em qualquer processo de produção e no da cerveja também. No caso da produção da industrial, as matérias-primas são necessárias em maiores quantidades, sendo, portanto, selecionados ingredientes menos dispendiosos. No caso da produção de cerveja artesanal, sendo esta produzida em menores quantidades, as suas matérias-primas são selecionadas mais cuidadosamente pois o tipo de produto final pretendido é mais específico e particular [5].

O processo de produção tem início na moagem dos grãos de malte selecionados, neste primeiro passo os grãos são moídos cuidadosamente de modo a abrir o grão, mas não o esmagando por completo para posteriormente facilitar o processo de filtração. Após a moagem os grãos secos e moídos são transferidos para um tanque que já contém a água necessária previamente aquecida a uma temperatura entre 45°C e 55°C para que haja hidratação. A regra geral da medição da quantidade de água é de 33,33% (m/v), sendo uma parte desta absorvida pelos grãos na proporção de 1:1. Depois há um ligeiro aumento da temperatura até cerca dos 60°C, a água quente irá transformar o malte, ou seja, a esta temperatura as enzimas hidrolisam o amido de modo a serem obtidos os açúcares fermentáveis, ou seja, a glucose. Esta conversão de amido dos grãos de malte, é a etapa denominada de brassagem que tem uma duração de entre 1h a 1h30m. A fase líquida obtida na brassagem, já contendo os açúcares fermentáveis dissolvidos na sua composição passa a denominar-se de mosto de cervejeiro. Após a brassagem, a fase líquida obtida é drenada e volta-se a fazer nova extração dos grãos com um volume extra de água de modo a extrair a quantidade máxima de açúcares dos grãos. No final da brassagem a temperatura é aumentada de modo a parar toda a atividade enzimática e a fluidizar mais a mistura, facilitando a extração dos açúcares para o mosto [5], [13].

Passa-se então para o processo de clarificação, fazendo a separação da fase sólida do mosto por filtração. Os sólidos são decantados para o fundo do tanque e formam um bolo filtrante de modo a reter cada vez mais os sólidos. Neste ponto do processo há recirculação do mosto do fundo do tanque para o seu topo sendo continuamente filtrado. A recirculação continua até que o mosto do fundo do tanque saia mais clareado. A quantidade de água utilizada nesta etapa é de  $1,5 \times$  a quantidade de água adicionada na brassagem estando a uma temperatura superior a  $76^{\circ}\text{C}$  para melhor extração de açúcares, mas inferior a  $78^{\circ}\text{C}$  de modo a evitar a extração de taninos existentes nas cascas dos grãos, pois estes conferem paladares e aromas indesejados no produto final [5], [7].

Obtendo-se o mosto da filtração, este é então levado à fervura durante cerca de 1h a 1h30m de modo a aumentar a sua concentração de açúcares, elevando a sua densidade. É nesta fase que o lúpulo é adicionado de modo a conferir amargor, sabor ou aroma à cerveja, dependendo se é adicionado no início, meio ou final da ebulição [5], [14].

De seguida passa-se para a fase de arrefecimento, o *Cold Crash*, que é feito rapidamente para proporcionar um choque térmico à mistura, de modo a facilitar a decantação das proteínas precipitadas e para facilitar a recolha do mosto, sem que haja precipitação posterior. Com o arrefecimento, chega-se a uma temperatura mais favorável à adição das leveduras para a sua inoculação ( $20^{\circ}\text{C} < T < 25^{\circ}\text{C}$ ). As leveduras são então adicionadas, reproduzem-se e quando se encontram num ambiente ausente em oxigénio vão formar dióxido de carbono e etanol consumindo os açúcares do mosto. Nesta fase o pH da cerveja vai sendo reduzido pela ação das leveduras. Para detetar o final da fermentação é medida a densidade do mosto até que

este chegue à desejada. Esta etapa tem por norma uma duração de 1 a 2 semanas [5], [13].

Industrialmente no final da fermentação a cerveja passa por um processo de clarificação, onde é filtrada com um filtro de poro muito reduzido usando um meio filtrante biológico ou não, de modo a que sejam separados todos os sólidos da fase líquida, ficando com uma cerveja cristalina. Esta é então armazenada em tanques a 0°C durante semanas para que ocorra a precipitação de proteínas instáveis, leveduras e resinas para que no final o produto final seja o mais cristalino possível. Por norma no fabrico industrial de cerveja o dióxido de carbono é injetado diretamente na garrafa de modo a que possa ser logo comercializada após o seu engarrafamento e de modo a garantir a homogeneidade do produto final de fábrica [15].

No caso do fabrico artesanal, no final da fermentação é adicionado açúcar e a cerveja é engarrafada e deixada a maturar durante semanas de modo a que o dióxido de carbono produzido pelas leveduras gasifique o produto final. Não passando por mais nenhum processo de clarificação, a cerveja artesanal apresenta um aspeto mais turvo e menos homogêneo, sendo possível observar a decantação de proteínas, lúpulo e leveduras no fundo de cada garrafa [5].

No caso das cervejas industriais o objetivo é captar a atenção do consumidor, apresentam então rótulos com mais cores e mais estimulantes visualmente. Nas cervejas artesanais os rótulos são mais históricos, apresentam as histórias da produção, do produtor ou mesmo dos ingredientes utilizados, falando detalhadamente sobre a bebida que originam e sugerindo como a degustar [5], [15].

## **2.2. Metabolismos de leveduras**

Ao analisar uma célula microbiana verifica-se que mais de 95% do seu peso seco é constituído por elementos característicos de uma matéria orgânica: carbono, oxigénio, hidrogénio, azoto, enxofre, fósforo, potássio, cálcio, magnésio e ferro. Para além dos nutrientes

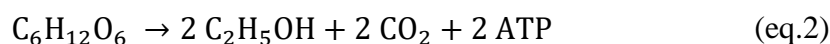
principais, todos os microrganismos necessitam de outros componentes, os micronutrientes, mas a concentração que requerem é muito reduzida. Os micronutrientes são por norma parte das enzimas e cofatores e auxiliam na catálise das reações e na manutenção da estrutura proteica [16].

As leveduras, mais especificamente a *Saccharomyces cerevisiae*, são utilizadas na indústria cervejeira pois produzem etanol quando em condições de anaerobiose. Por outro lado, para cultivar este tipo de culturas são necessários ambientes ricos em oxigénio, para que ocorra replicação celular. Nas leveduras, organismos heterotróficos o metabolismo energético e do carbono estão interligados. No início, quando há presença de oxigénio, ou seja, num ambiente aeróbico, dá-se a respiração e a glucose é degradada a água e dióxido de carbono formando energia, para biossíntese celular e replicação. Quando deixa de haver disponibilidade de oxigénio a *S. cerevisiae* encontra-se num ambiente anaeróbico, muda o seu metabolismo para a fermentação alcoólica, originando então etanol e dióxido de carbono. Estequiometricamente, na fermentação alcoólica é produzida muito menos energia por cada molécula de glucose que é convertida em etanol e dióxido de carbono, funcionando esta reação como a principal fonte de energia para a sua manutenção. A respiração trata-se de um processo mais eficiente do que a fermentação do ponto de vista energético. Em seguida apresentam-se as respetivas equações (eq.1 e eq.2) [17], [18]:

Respiração:



Fermentação:





### **2.2.1. Meios de Cultura**

Muito do estudo de microbiologia depende da habilidade de crescer e manter microrganismos no laboratório e isto apenas é possível utilizando meios de cultura. Um meio de é uma solução em estado líquido com a função de promover o crescimento e armazenar os microrganismos, e para ser eficiente tem que conter todos os nutrientes necessários ao microrganismo para poder haver crescimento. Apesar de todos os microrganismos necessitarem de fontes de energia, carbono, azoto, fósforo, enxofre e vários minerais, a composição específica de um meio depende da espécie a ser cultivada porque os requisitos nutricionais variam bastante entre espécies. Conhecimento do habitat natural dos microrganismos é necessário para criar os meios sintéticos apropriados pois os seus requisitos nutricionais refletindo o seu ambiente natural. Um meio onde todos os seus componentes químicos são conhecidos, trata-se de um meio sintético, ou meio definido, este pode vir em solução, o estado líquido ou solidificado por um agente, como ágar [16].

### **2.2.2. Isolamento de Culturas Puras**

No seu habitat natural os microrganismos crescem misturados com muitas outras espécies, o que dificulta o seu estudo, pois um simples tipo de microrganismo não pode ser estudado adequadamente numa cultura mista. Para caracterizar uma espécie individual é necessária uma cultura pura dessa espécie, originada de uma só célula. Para isolar uma cultura pode usar-se uma placa de Petri com meio de crescimento sólido, contendo agar, deitando um pouco de suspensão líquida da cultura que se pretende isolar. Uma das formas de isolar a cultura será usar uma pequena quantidade de uma solução diluída da cultura, contendo entre 30 a 300 células e espalhá-la na placa uniformemente usando um espalhador adequado. Desta forma é possível contabilizar o número de células viáveis da solução utilizada, pois o número de colónias que crescerem será o número de células

vivas, viáveis e cultiváveis, este método é usado para CFU's (unidades formadoras de colônias). As culturas podem também ser isoladas utilizando placas de ágar para fazer um riscado. Uma pequena porção da solução da cultura é transferida para um canto da placa a ser utilizada e utilizando uma ansa de inoculação é espalhada por riscos na placa, iniciando na cultura e riscando por cima de forma a isolar as células formando um padrão de riscado. Uma grande parte dos produtos industriais de culturas microbianas são produzidos em cultura pura [16], [19].

### **2.2.3. Crescimento Microbiano**

O ciclo celular é uma sequência completa desde a formação da nova célula até à sua próxima divisão. A reprodução das leveduras, fungos unicelulares, faz-se por gemulação, ou seja, a célula mãe vai criando uma célula filha até que esta se separa da progenitora. [16].

### **2.2.4. Curva de Crescimento**

O crescimento microbiano pode ser seguido através da realização da curva de crescimento em descontínuo. Quando as culturas são inoculadas, em cultura pura, não são fornecidos novos nutrientes que permitem o crescimento da cultura continuar, ou seja, a concentração de nutrientes vai diminuindo e a concentração de produtos vai aumentar no meio de cultura. A curva de crescimento é obtida através do logaritmo do número de células ou concentração de células versus o tempo de incubação tal como se pode ver na Figura 2.1. Esta curva de crescimento é dividida em quatro fases: a fase lag, a fase exponencial, a fase estacionária e a fase de morte[16].



**Figura 2.1** – Exemplo de curva de crescimento

Ao serem inoculados num novo meio de cultura, os microrganismos não têm um crescimento imediato, necessitam de uma fase de adaptação ao novo meio: a fase lag. Nesta primeira fase, as células sintetizam novos componentes necessários para o seu crescimento e pode ser mais longa, se o meio de onde a cultura inicial foi transferida for diferente do meio onde esta foi inoculada pois as células vão necessitar de sintetizar novas enzimas para os nutrientes, diferentes daqueles a que foram expostas. Esta fase pode também alongar a sua duração se a cultura usada for velha, ou não tiver muitas células viáveis pois irá requerer um maior tempo de adaptação[16].

Após a fase lag, vem a fase exponencial, por vezes também chamada de log que é quando existe a maior taxa de crescimento dos microrganismos. Durante esta fase a taxa de crescimento é constante, a cultura encontra-se uniforme em termos bioquímicos e propriedades fisiológicas e, portanto, nesta fase as culturas têm um crescimento equilibrado.

Após todos os nutrientes do meio terem sido consumidos pela cultura esta entra na fase estacionária onde o número de mortes celulares iguala a o número de divisões celulares, ou seja, não há crescimento celular visível na curva e os nutrientes do meio encontram-se quase esgotados.

Por fim, temos a fase de morte, nesta fase, o meio de crescimento já não contém nutrientes que permitam aos microrganismos

continuarem a biossíntese para proceder à divisão celular nem para manutenção celular, há apenas morte celular. Nesta fase a curva decresce porque apenas existe morte e lise celular [16].

### **2.2.5. Taxa específica de crescimento**

Fazendo a representação gráfica do logaritmo da concentração celular em função do tempo de fermentação, na fase exponencial obtém-se uma função exponencial que pode ser representada pela equação 3, onde  $X_t$  é a concentração celular ao longo do tempo,  $X_0$  é a concentração celular no início da fase exponencial e  $\mu$  é a taxa específica de crescimento do microrganismo em causa nas condições de crescimento testadas. Este parâmetro do crescimento, que reflete a sua cinética corresponde ao declive da reta que resulta da representação gráfica do logaritmo natural do número de células em função do tempo.

$$X_t = X_0 \cdot e^{\mu t}. \quad (\text{eq.3})$$

A taxa específica de crescimento  $\mu$  está relacionada com o número de gerações (ou o tempo de cada geração) que ocorrem por unidade de tempo numa cultura em crescimento exponencial. Quanto maior esta taxa, mais rapidamente se divide a população, maior será o número de gerações que ocorrem no mesmo período de tempo e menor é o tempo de cada geração [16], [19].

### **2.2.6. Biorreatores**

Um reator biológico é, muito simplesmente um tanque onde ocorrem várias reações biológicas em meio líquido. O meio deve ser favorável ao crescimento microbiano, devendo conter certos nutrientes ou substratos (fontes de carbono, azoto, oxigénio, micronutrientes,...). Para que as reações ocorram, o tanque deve favorecer certas condições ambientais também favoráveis ao

crescimento microbiano, como a temperatura, o pH, arejamento e agitação.

Os biorreatores são essenciais em processos biotecnológicos e o custo global do processo depende em grande parte da sua eficiência. As reações em biorreator estão dependentes das características das culturas microbianas utilizadas. Quando se dimensiona um biorreator o objetivo é maximizar a sua produtividade volumétrica, mas tem que se ter em conta a integração com o processo de separação/purificação do produto. Em termos económicos os custos energéticos são considerados secundários e o balanceamento faz-se entre os nutrientes necessários e a cultura utilizada, ou seja, é justificável a utilização de nutrientes dispendiosos se o rendimento do processo é elevado e o produto final desejado também tiver um elevado custo de mercado.

Os bioreatores podem classificar-se em três tipos: descontínuos, semi-contínuos e contínuos. Numa operação em descontínuo, não há adição de substrato, para além da inicial, nem há retirada de produto final até ao final do processo. Num processo semi-contínuo os substratos necessários ao crescimento são alimentados continua ou intermitentemente sem retirada de meio de cultura. Neste caso, no início do processo o biorreator atua de modo descontínuo e no final pode proceder-se à recolha de todo o meio ou à recolha parcial de modo a repetir o procedimento. Por fim, num processo em contínuo o meio de cultura é adicionado de forma contínua ao processo durante o seu decorrer [20].



### **3. Materiais e Métodos**

#### **3.1. Esterilização e Assepsia**

Todos os materiais e soluções utilizadas foram esterilizados em autoclave (AJC® Uniclave 88) a uma temperatura de 121°C durante 21 min e todos os procedimentos experimentais que requeriam condições de assepsia foram realizados numa câmara de fluxo laminar (BBH4 Braun Horizontal) nível 1. Na câmara de fluxo laminar tudo o que era utilizado era previamente esterilizado e passado à chama quando necessário para diminuir o risco de contaminações.

#### **3.2. Meios de Cultura**

O meio YM sólido foi preparado em água destilada com a seguinte composição: 3,0 g/L de extrato de levedura; 3,0 g/L de extrato de malte; 5 g/L de peptona; 2,0% (m/v) de agar e 10 g/L de glucose. Para evitar a degradação dos açúcares durante a esterilização, este meio foi preparado em duas soluções separadas: uma contendo apenas a glucose e outra contendo os restantes componentes. O pH de cada solução foi ajustado a 5,5 antes de entrarem no autoclave.

Foram utilizados dois meios sintéticos líquidos para os ensaios iniciais: meio YM líquido e meio MS. O meio YM líquido foi preparado de forma análoga ao meio YM sólido, excluindo apenas a adição de agar na sua composição e aumentando a concentração de glucose para 20 g/L. O meio MS líquido foi preparado também em água destilada com a seguinte composição: 2,5 g/L de extrato de levedura; 2,0 g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ; 1,0 g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 0,5 g/L de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e 20 g/L de glucose. De modo a evitar a precipitação de sais de amónia e a degradação dos açúcares aquando da esterilização, o meio MS foi preparado em três soluções separadas: uma solução contendo o extrato de levedura e o  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; uma solução de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  e  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e uma solução contendo apenas a glucose.

### 3.3. Microrganismo e Manutenção

Para todas as experiências deste trabalho foi utilizada uma levedura liofilizada comercializada para a produção de cerveja, a *SafAle™ US-05*, que se trata da espécie *Saccharomyces cerevisiae*. Para fins de conservação da levedura, fizeram-se placas de Petri e foram feitos criotubos, congelados à temperatura de -80°C.

### 3.4. Criotubos

Partindo de um liofilizado comercial foi feita uma inoculação prévia num Erlenmeyer de 100 mL contendo 20 mL de meio YM, onde foi adicionada uma pequena quantidade de levedura liofilizada, com material estéril e trabalhando na câmara de fluxo laminar. O inóculo foi deixado a incubar durante a noite a uma temperatura controlada de  $28,0 \pm 0,5$  °C e uma agitação orbital de 180 rpm (B. Braun® Certomat® S) para que os criotubos fossem feitos no final da fase exponencial da levedura que é o momento em que se tem maior quantidade de biomassa viva, ativa. Assim que se verificaram estas condições procedeu-se à elaboração dos criotubos com o material devidamente esterilizado e trabalhando sempre em na câmara de fluxo laminar. Primeiro foram pipetados 2 mL de inóculo para cada Eppendorf e levaram-se a centrifugar a 2000 rpm durante 5 min. O sobrenadante foi descartado, pipetaram-se mais 500 µL de meio YM cada Eppendorf e agitaram-se os Eppendorfs no vortex. Pipetaram-se 400 µL de uma solução de glicerol 30 % (m/v) para cada Eppendorf que irá conter os criotubos e 400 µL da suspensão celular previamente obtida nos Eppendorfs anteriores. Agitaram-se os Eppendorfs dos criotubos e estes foram então congelados a -80°C. Sempre que existia necessidade de renovar as culturas, era



retirado um criotubo que depois de descongelado era utilizado para inocular placas de meio YM sólido, fazendo o riscado de modo a obter colônias isoladas. Estas placas serviam para a inoculação das experiências a executar e eram também utilizadas para inocular novas placas de modo a manter a cultura ativa durante cerca de um mês.

### **3.5. Fermentações**

#### **3.5.1. Pré-Inóculos e Inóculos**

Os pré-inóculos foram preparados em tubos de Falcon® (Corning®) de 50 mL por transferência de uma colônia da *S. cerevisiae* do meio de manutenção YM sólido em placa de Petri para um volume de 10 mL de meio sintético usado em cada ensaio. Este volume contendo a colônia foi levado a incubar durante 24 h a uma temperatura controlada de  $28,0 \pm 0,5$  °C e uma agitação orbital de 180 rpm (B. Braun® Certomat® S). Posteriormente foram preparados os inóculos em Erlenmeyers de 250 mL, utilizando 10% do seu volume. Para perfazer este volume, foram utilizados volumes de meio sintético líquido e de pré-inóculo de modo a obter uma densidade ótica de 0,5 a 620 nm. Os inóculos preparados foram incubados nas mesmas condições que os pré-inóculos.

##### **3.5.1.1. Ensaio em Erlenmeyer**

Foram realizados dois ensaios em Erlenmeyer utilizando diferentes meios: um utilizando meio MS líquido e outro utilizando meio YM líquido.

Os ensaios em descontínuo foram realizados em Erlenmeyers de 500 mL, utilizando apenas 200 mL do seu volume total. Para a preparação deste volume foram utilizados volumes do meio sintético em teste e de inóculo de modo a obter uma densidade ótica de 0,5 a 620 nm. Após a inoculação, foi retirada uma amostra inicial e o Erlenmeyer foi levado a incubar a  $28 \pm 0,5$ °C, com agitação orbital de 180 rpm (B.

Braun® Certomat® S). Foram retiradas amostras ao longo do tempo até à fase estacionária, de modo a monitorizar os resultados em termos de concentração celular, açúcares redutores, pH e centrifugou-se a amostra e recolheu-se o sobrenadante para posteriormente quantificarem-se os açúcares redutores.

## **3.6. Métodos Analíticos**

### **3.6.1. Determinação do Peso Seco**

Para a determinação do peso seco, foi retirada uma alíquota de 5,00 mL de amostra durante a fase exponencial. Esta alíquota foi filtrada a vácuo, com filtros de poro 0,45 µm, e lavada com o seu triplo de volume de água destilada (15 mL). Fizeram-se 3 replicas em cada ensaio. Os filtros foram levados à estufa em placas de Petri de vidro a 105 °C até que o seu peso fosse constante. No final os filtros com a biomassa foram pesados, foi subtraída a massa inicial do filtro e obteve-se desta forma o peso seco por mL. Obteve-se assim a concentração de biomassa no final da fase exponencial em g/L.

### **3.6.2. Quantificação de Biomassa**

Foi retirada uma porção de amostra no final da fase exponencial de uma cultura líquida de modo a poder realizar diversas diluições da amostra. A densidade ótica dessas diluições foi medida num espectrofotómetro (Shimadzu® UVmini-1240®) a 620 nm de modo a obter o valor da absorvância para cada diluição. Com o valor médio de concentração de cultura líquida em massa seca, obtido do peso seco, obteve-se a concentração de biomassa para cada diluição, conseguindo assim uma reta de calibração que exprime a densidade ótica para cada valor de concentração diluída.

### **3.6.3. CFU's**

Para a contagem de células vivas foi preparada uma solução de NaCl com concentração 0,9 % (m/v) da qual foram pipetados 4,5 mL para cada tubo de ensaio a ser utilizado que foram posteriormente esterilizados na autoclave. Para o primeiro tubo de ensaio foram recolhidos 0,5 mL de amostra, em esterilidade, na fase estacionária das fermentações líquidas. Assim, no primeiro tubo de ensaio a amostra encontrava-se com uma diluição de 10. Deste tubo de ensaio, recolheram-se 0,5 mL para o segundo tubo de ensaio, obtendo-se uma diluição de  $10^2$ . E assim sucessivamente de modo a que o leque de diluições da amostra fossem de 10 a  $10^9$ . Estas diluições foram repetidas 3 vezes, sempre em condições de assepsia. Com as diluições  $10^4$  a  $10^8$  inocularam-se placas com meio YM sólido pipetando 100  $\mu$ L para cada uma e usando um espalhador de modo a que a distribuição em cada placa fosse mais uniforme. Todo o processo de inoculação foi realizado na câmara de fluxo laminar à chama. Uma vez inoculadas e seladas as placas foram levadas a incubar por um período de 48 h a 28°C. Após o período de incubação foram contadas as colónias da cada placa, sendo que apenas foram tomadas em consideração, as que possuíam entre 30 a 300 colónias vivas.

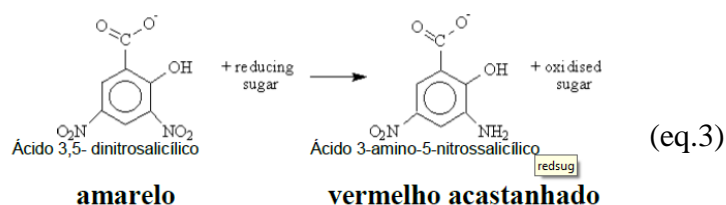
### **3.6.4. Medição de pH**

O pH das amostras da fermentação foi monitorizado usando para isso um medidor Consort<sup>®</sup> C833 equipado com um eletrodo de pH (Sentek<sup>®</sup> P11/HA).

### **3.6.5. Quantificação de Açúcares Redutores**

Durante a monitorização da fermentação, cada amostra, depois de lido o seu pH e a sua densidade ótica, foi centrifugada a 13000 rpm durante 2 min de modo a recolher o seu fluído sobrenadante. Esse fluído foi utilizado posteriormente para a quantificação de açúcares redutores.

A medição de açúcares redutores foi efetuada recorrendo ao método colorimétrico do ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS). Este composto apresenta uma cor amarela e ao ser reduzido, os seus grupos carbonilo são oxidados de acordo a equação 3 apresentando então uma cor tijolo.



Fez-se uma reta de calibração da absorvância a 540 nm versus a concentração de açúcares redutores. Partindo de uma solução padrão glucose (1 g/L), prepararam-se diferentes diluições de modo a obter diferentes padrões de concentrações. Para este ensaio foram adicionadas alíquotas de 0,5 mL de cada diluição a diferentes tubos de ensaio, adicionando posteriormente 0,5 mL de DNS a cada um. Os tubos de ensaio foram agitados no vórtex por ordem e levados a banho de água destilada a 100 °C durante 5,00 min e depois colocados de imediato em gelo até arrefecerem por completo. Após serem retirados do gelo foram adicionados 5 mL de água destilada a cada tubo e foram novamente agitados no vórtex. Por fim foram lidas as suas absorvâncias a 540 nm.

Para amostras recolhidas o procedimento foi feito de forma análoga, sendo que em cada amostra foram efetuadas diluições quando necessárias e no final foi lida a sua densidade ótica a 540 nm podendo assim obter-se a concentração de açúcares para cada amostra.

### 3.7. Cálculos

#### 3.7.1. Parâmetros Cinéticos e Estequiométricos

A taxa específica de crescimento máximo,  $\mu_{\text{máx}}$  ( $\text{h}^{-1}$ ), foi obtida através do declive da reta  $\ln(\text{Biomassa})$  vs tempo (h) na fase exponencial de crescimento [21].

O rendimento,  $Y_{x/\text{substrato}}$  em ( $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) foi calculado de acordo com a equação 4 [21].

$$Y_{x/\text{substrato}} = \frac{[\text{Biomassa}]}{[S_c]} \quad (\text{eq.4})$$

Onde  $[S_c]$  é a concentração de substrato consumido em g/L e  $[\text{Biomassa}]$  é a concentração de biomassa máxima em g/L.

A produtividade,  $P_x$  em ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ) , foi calculada segundo a equação 5 [21].

$$P_x = \frac{[\text{Biomassa}]}{t} \quad (\text{eq.5})$$

Onde  $t$  é o tempo em h e  $[\text{Biomassa}]$  é a concentração de biomassa máxima em g/L.

#### 3.7.2. Taxas de evaporação

As taxas de evaporação em mL/h foram calculadas para ensaios com água e com meio e cultura segundo a equação 6.

$$\text{taxa de evaporação} = \frac{V_{\text{evaporado}}}{t} \quad (\text{eq.6})$$

Onde  $V_{\text{evaporado}}$  foi o volume que evaporou durante a fermentação em mL e  $t$  o tempo da fermentação em h.



## **4. Resultados e Discussão**

### **4.1. Produção de Cerveja na Fábrica**

Para o processo de produção de cerveja, apenas são essenciais 4 ingredientes: água, malte, lúpulo e levedura.

A primeira fase da produção passa pela a moagem do grão, que poderá ser grão de malte de cevada e/ou de trigo. A fase de moagem do grão tem como objetivo apenas abrir o grão, descascando-o e nunca o moendo completamente devido à extração dos açúcares e para facilitar a posterior filtração. Assim, quando é moído, expõem-se o endosperma contido no interior dos grãos, que é rico em amido, para que durante a brassagem, as enzimas quebrem este amido em açúcares menores, para que possam ser posteriormente consumidos pela levedura no processo de fermentação. Quando é demasiado moído, o grão cria farelo o que dificulta a sua separação do mosto tornando-o mais turvo. Após ser moído, o grão é transferido para o tanque onde foi colocada a água previamente preparada para o tipo de cerveja a produzir e previamente aquecida ( $70^{\circ}\text{C} > T > 74^{\circ}\text{C}$ ). Por norma, a água necessária é medida na proporção de 4 L para 1 kg de grão, apesar de a maior parte dos cervejeiros optar por diminuir esta proporção para facilitar o processo, pois quanto maior a quantidade de água adicionada, mais dispersas ficarão as enzimas, diminuindo assim a sua atuação constante sobre o amido. Alguma parte da água é absorvida pelos grãos na proporção de 1:1.

Passa-se então para a brassagem onde a água quente irá hidratar o malte, gelatinizando os seus amidos libertando as suas enzimas e convertendo então os amidos em açúcares fermentáveis. Apesar de meia hora ser suficiente para que se dê a conversão desejada, por norma é dada entre 1 hora a 1h30m do processo para esta etapa que se realiza entre  $T=65^{\circ}\text{C}$  e  $T=68^{\circ}\text{C}$ . Após o tempo predefinido, é drenado o líquido, denominado de mosto, e os grãos voltam a ser infundidos com

um volume extra de água para ter a certeza que foram extraídos todos os seus açúcares. A mistura é mexida, deixada em repouso e novamente drenada. A temperatura da brassagem não deverá exceder os 70°C, pois a temperaturas superiores a conversão do amido é inibida o que resultará num mosto menos fermentável. A temperatura apenas tem que ser elevada o suficiente para se conseguir extrair os açúcares, o que será  $T > 60^{\circ}\text{C}$ . A temperaturas perto dos 60°C temos conversão dos amidos em açúcares fermentáveis desejados, ao aproximarmo-nos dos 70°C, a conversão é feita em açúcares mais complexos, as dextrinas, que não serão fermentadas pelas leveduras. Esta conversão de açúcares é designada de maltagem, que muito simplesmente, se explica como sendo uma pré-germinação do grão que faz com que este ao germinar decomponha açúcares. Todas as reservas de amido contidas nos grãos estão fechadas em matrizes proteína/carboidratos que dificultam a conversão desses amidos pelas enzimas. Durante a maltagem, a  $\beta$ -glucanase e as enzimas proteolíticas fazem o seu trabalho de modificação, abrindo as matrizes dos amidos para facilitar o acesso e conversão para açúcares. Podem ocorrer mais uma pequena quantidade de modificações durante a maltagem, mas a principal é a conversão do amido em açúcares fermentáveis e de dextrinas não fermentáveis por enzimas diastáticas. Cada grupo destas enzimas pode ser influenciado por diferentes temperaturas e pH, sendo a atividade enzimática mais dependente da temperatura. A temperatura da brassagem pode então ser ajustada sucessivamente para cada função das enzimas, podendo assim ser customizado o mosto ao agrado e propósito pretendido. Ao serem abertas as matrizes os amidos gelatinizam, facilitando a ação da  $\alpha$ -amílase que quebra as cadeias longas dos amidos, originando cadeias mais pequenas (dextrinas), o que reduz significativamente a viscosidade da mistura, dando-se uma



liquefação da mistura. Estas cadeias mais curtas passam a estar acessíveis às restantes enzimas diastáticas:  $\beta$ -amílase, dextrinase limite e  $\alpha$ -glucosidase. Começa então a conversão destas cadeias de amido gelatinizadas mais curtas em açúcares fermentáveis, completando a sacarificação.

Segue-se o processo de clarificação que se baseia na separação do mosto da mistura por filtração e que por norma consiste em 3 etapas: *mash-out*, recirculação e *sparging*. Antes do mosto ser drenado da mistura e do grão ser lavado dos açúcares residuais, muitos cervejeiros executam o *mash-out*. Este passo consiste num aumento de temperatura antes da separação do mosto para que toda a ação enzimática pare, fluidizando mais a mistura. O *mash-out* torna-se desnecessário no caso de a mistura ter um rácio de água muito elevado, mas é importante quando a mistura é mais espessa pois torna os açúcares mais fluídos facilitando a sua extração na separação do mosto. Após o leito de grãos estabilizar (o leito deve ser mantido fixo para evitar a passagem de sólidos na extração), começa a recirculação. Primeiro é drenado algum mosto do fundo que é reciclado para o topo do tanque, durante esta etapa, o tanque deve permanecer tapado para que não hajam perdas de temperatura. Ao ser devolvido ao tanque, o mosto deve escoar por uma escumadeira de modo a evitar que ocorram perfurações na malha filtrante formada pelos grãos durante o repouso, assim como é mostrado na Figura 4.1.



**Figura 4.1** - Processo de recirculação para o tanque

Inicialmente nota-se que o mosto sai mais turvo e com algumas partículas de grãos, mas com a repetição da recirculação, o mosto vai clareando gradualmente. Depois da recirculação passa-se para o *sparging*, que deriva de “*to sprinkle*” que se baseia essencialmente na lavagem dos grãos para que sejam extraídos para o mosto o máximo de açúcares possível. O método de *sparging* mais utilizado é o *fly-sparging* ou *continuous sparging* que consiste essencialmente na adição de água quente sobre os grãos através da escumadeira como na recirculação. Esta água deverá estar a uma temperatura superior a 76°C para uma melhor extração do grão, mas deverá ter uma temperatura inferior a 78°C para que não sejam extraídos taninos das cascas dos grãos pois estes conferem um paladar e aromas indesejados no produto final. A quantidade de água adicionada nesta fase é tipicamente 1,5× a quantidade adicionada na fase de brassagem. A água é continuamente adicionada, o mosto será substituído por água e esta etapa deverá ter fim quando a densidade atingir 1,012 (não deverá ser inferior a isso) ou quando a quantidade de água chegar ao fim. No final tem se o mosto no tanque pronto a ser levado à fervura e os grãos do filtrado são recolhidos para ração animal (Figura 4.2).



**Figura 4.2** – Grãos do filtrado recolhidos para ração animal

O mosto obtido das etapas anteriores é então levado à fervura. Esta etapa é importante pois é responsável pela formação de uma parte dos aromas e sabores da cerveja. O objetivo é

aumentar a concentração do mosto em açúcares, elevando a sua densidade. Serve também para a esterilização do mosto, eliminando alguns microrganismos indesejáveis como bactérias e leveduras, evitando contaminação futura. Nesta fase, o tanque deve encontrar-se destapado e deverá ter uma duração de 60 a 90 min. O tempo de fervura é contado regressivamente e é durante a mesma que são adicionados os lúpulos. Os lúpulos podem ter 3 funcionalidades na receita: podem servir para conferir o amargor típico da cerveja (neste caso é adicionado no início da fervura,  $90 \geq t \geq 60$  min), para o sabor ( $20 \geq t \geq 10$  min) ou para o aroma (no final da fervura,  $5 \geq t \geq 0$  min). Os lúpulos destinados a conferir amargor contêm uma quantidade elevada de  $\alpha$ -ácidos (acima de 10% do seu peso), são insolúveis na água, sendo necessário que passem por um processo de isomerização para que se dissolvam, por isso necessitam de passar mais tempo na fervura. Os óleos aromáticos tendem a evaporar-se conforme a fervura, portanto este lúpulo não afetará o aroma da cerveja. Os lúpulos utilizados para adicionar sabor ou aroma à cerveja contêm uma grande quantidade de óleos aromáticos e uma baixa quantidade de  $\alpha$ -ácidos, sendo melhor aproveitados quando adicionados na fase final da fervura. Após a fervura, é adicionado musgo (alga) como agentes clarificadores pois fazem ligação com as proteínas que estão em suspensão no meio para que precipitem.

De seguida passa-se para a fase de arrefecimento, que é feito rapidamente e denominando-se *Cold Crash*. Proporcionando um choque térmico à mistura é favorecida a decantação das proteínas para o fundo do tanque, facilitando assim a recolha do mosto sem estas substâncias. O facto de o arrefecimento ser feito rapidamente também tem a vantagem de eliminar a produção do dimetil sulfato (DMS). Esta substância confere um sabor de vegetais cozidos à cerveja, o que não é muito adequado, é desenvolvido no mosto enquanto este está quente e vai se eliminando por evaporação. Assim, causando o choque térmico, evita-se a formação deste. O arrefecimento também proporciona uma

temperatura favorável à adição das leveduras para a sua inoculação, estas se fossem adicionadas a uma temperatura elevada morreriam. Idealmente, o arrefecimento deve ser feito num permutador de calor de placas ou tubular. Num permutador de tubos, a filtração é mais fácil, mas o arrefecimento é menor e menos rápido, sendo o de placas mais eficiente. O mosto é então passado para o fermentador e deixado aberto para que haja uma introdução suficiente de oxigénio para auxiliar a multiplicação de leveduras para uma melhor fermentação.

As leveduras usadas normalmente são leveduras liofilizadas e são hidratadas à temperatura ambiente ( $T=20^{\circ}\text{C}$ ) antes de serem adicionadas ao fermentador, a quantidade de água ideal é de 10 mL para cada grama de levedura. A levedura deve ser adicionada à água, devem ser dados uns minutos de adaptação e depois deve ser mexida suavemente a cada 5 min. Após aparentar estar homogénea, o recipiente deverá ser tapado durante uns 20 min antes da sua adição ao fermentador. As leveduras devem ser hidratadas, pois ao serem adicionadas a seco ao mosto haverá um retardo no início da fermentação, proporcionando um maior risco de contaminação e uma perda de cerca de 50% de células viáveis. A reidratação da levedura permite uma recomposição das suas células e o fortalecimento da sua parede celular.

Após os 20 min de espera, a levedura pode ser adicionada ao fermentador que contém o mosto. Durante a fermentação, as leveduras irão consumir os açúcares fermentáveis do mosto, formando álcool e  $\text{CO}_2$ . Irá haver uma redução do pH da cerveja, e serão apurados os aromas e sabores. O tempo e a temperatura desta etapa variam consoante a receita, mas o período normal de fermentação é de aproximadamente 2 semanas.

A fermentação ocorre essencialmente em 3 fases: a fase lag, fase de crescimento e fase estacionária. A primeira fase, a fase lag, trata-se de uma fase de adaptação da levedura ao meio, condições do mosto e absorção de oxigénio, minerais e aminoácidos para sintetização de proteínas e pode demorar até cerca de 15 horas. Apesar desta fase ser determinante à fermentação, durante esta não se notam quaisquer alterações. A fase seguinte, de crescimento é quando realmente decorre a fermentação onde os açúcares fermentáveis serão convertidos em álcool e CO<sub>2</sub>. Esta fase pode ter uma duração de 2 a 6 dias para cervejas do tipo *Ale* e 4 a 10 dias para *lagers* e poderá haver formação de espuma devido às leveduras e proteínas do mosto durante a mesma. Por fim, na fase estacionária, a fermentação encontra-se quase completa e poderá saber-se o seu fim através da densidade da cerveja. Os fermentadores, apresentados na Figura 4.3, têm uma geometria que facilita a deposição de lúpulo, levedura e proteínas no fundo, podendo, no final da fermentação, ser extraída a cerveja com maior facilidade.



**Figura 4.3** – Fermentadores de cerveja.

Quando a fermentação está completa passa-se para o engarrafamento da cerveja, mas antes de ser engarrafada é adicionado açúcar para que haja fermentação na garrafa pois não é injetado gás nas garrafas. O engarrafamento ocorre de acordo com a Figura 4.4 e é feito à pressão atmosférica.



**Figura 4.4** – Processo de engarrafamento da cerveja.

O engarrafamento também pode ser feito em barril, como é demonstrado na Figura 4.5.



**Figura 4.5** – Engarrafamento de cerveja em barril

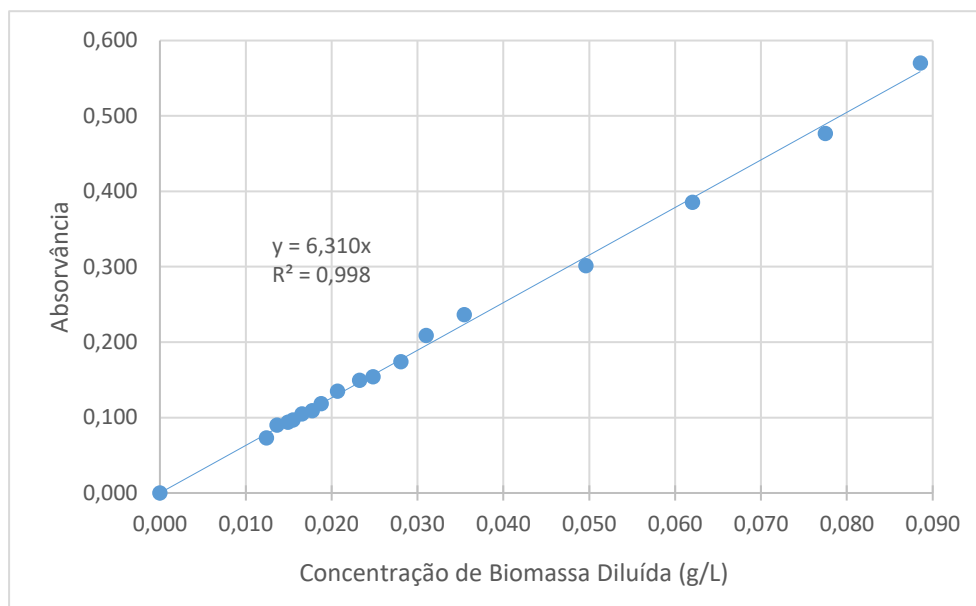
Por fim, chegamos à fase de maturação que ocorre dentro da garrafa e demora entre 2 a 3 semanas pois é o tempo necessário à formação de álcool e  $\text{CO}_2$  através do açúcar adicionado antes do engarrafamento. No final da maturação é visível um depósito no fundo da garrafa de levedura, lúpulo e proteínas.

## **4.2. Ensaio em Erlenmeyer**

### **4.2.1. Curva de Calibração (Peso Seco)**

Para poder seguir a concentração de biomassa ao longo do tempo fez-se uma curva de calibração para cada meio de crescimento estudado através dos valores mássicos obtidos do

peso seco de modo a relacionar a densidade ótica lida a 620 nm com valores de concentração mássica. Estes dados foram representados graficamente como absorvância vs concentração de biomassa e encontram-se representados na Figura 4.6 para o meio MS. Fez-se a regressão linear de modo a obter a curva de calibração para o meio MS entre a absorvância e a concentração de biomassa.

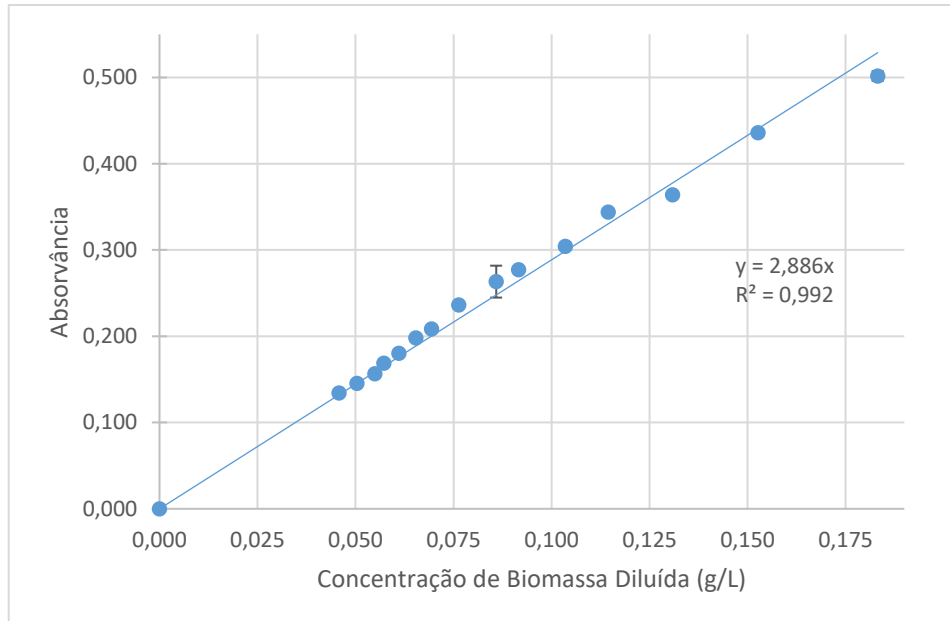


**Figura 4.6** – Curva de calibração biomassa vs tempo para o meio MS.

Da regressão linear no meio MS obteve-se a equação 7:

$$Absorvância = 6,310 \cdot C_{biomassa} \quad (\text{eq.7})$$

Para a o meio YM os resultados estão apresentados na Figura 4.7.



**Figura 4.7** – Curva de calibração biomassa vs tempo para o meio YM.

Da regressão linear do meio YM obteve-se a equação 8:

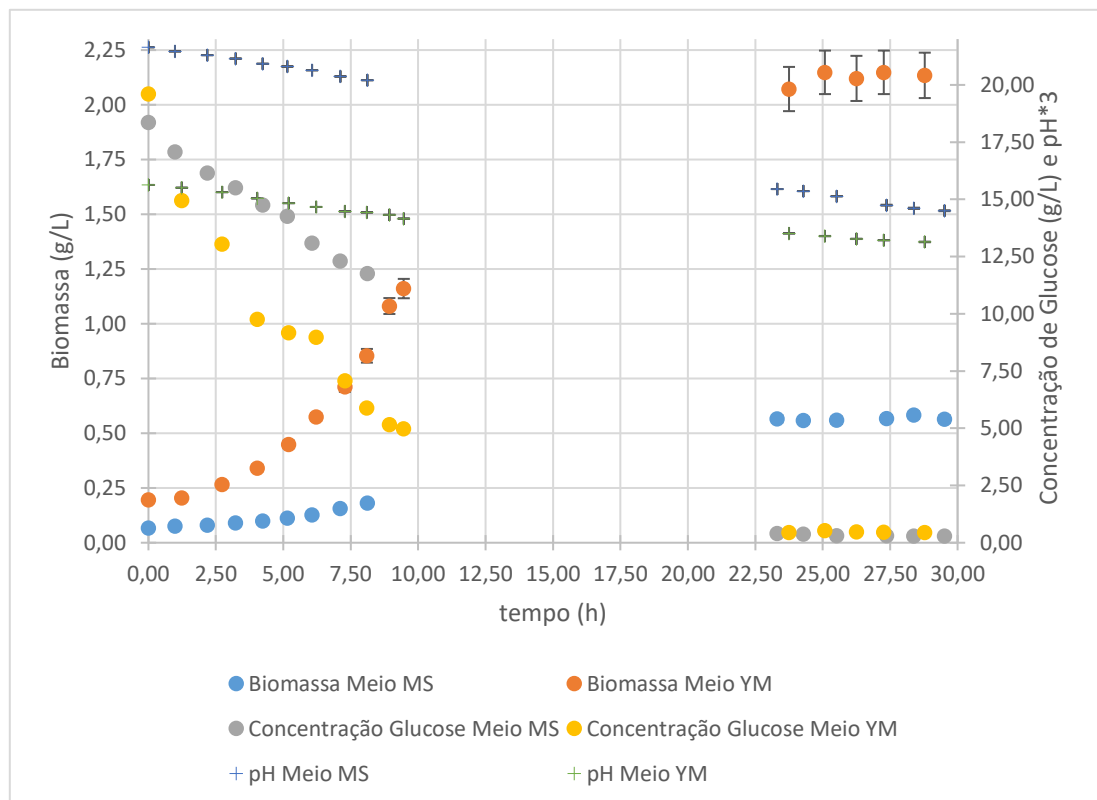
$$Absorvância = 2,886 \cdot C_{biomassa} \quad (\text{eq.8})$$

#### 4.2.2. Comparação de meios sintéticos

Inicialmente foram realizados dois ensaios em Erlenmeyer: um utilizando o meio sintético YM líquido e outro utilizando o meio sintético MS líquido. Com a realização destes ensaios pretendia-se determinar qual o meio que proporcionava um crescimento mais acentuado para a *S. cerevisiae*. O meio YM trata-se de um meio mais rico, mas também mais dispendioso, enquanto que o meio MS é mais rentável em termos económicos. Seria de esperar obter melhor resultados com o meio YM, mas com esta comparação pretendia-se verificar se o investimento num meio mais dispendioso era justificável. Ambos os ensaios



foram realizados às mesmas condições de incubação, com a mesma concentração inicial de glucose e a mesma densidade ótica, de 0,500. A concentração de Biomassa *vs* tempo está descrita na Figura 4.8, bem como a concentração de glucose ao longo do tempo e o pH do meio.

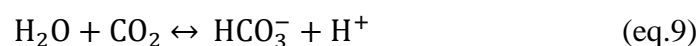


**Figura 4.8** – Comparação da concentração de biomassa *vs* tempo no meio MS e no meio YM e monitorização da concentração de glucose e do pH durante a fermentação.

Como se pode observar, existe consumo de açúcar desde o início da fermentação até às 10h de fermentação nos dois casos. Este consumo de glucose é feito para crescimento celular, como se pode observar pela concentração de biomassa face à concentração de glucose em qualquer um dos meios. Entre as 10h e as 22h30min o consumo de glucose terminou e não houve mais crescimento. Neste intervalo de tempo terminou a fase exponencial e iniciou-se a fase estacionária. Pode observar-se também que no meio YM houve um crescimento de biomassa maior e mais rápido do que no meio MS. No meio MS ocorreu consumo de toda a glucose no meio, bem como no meio YM, mas no

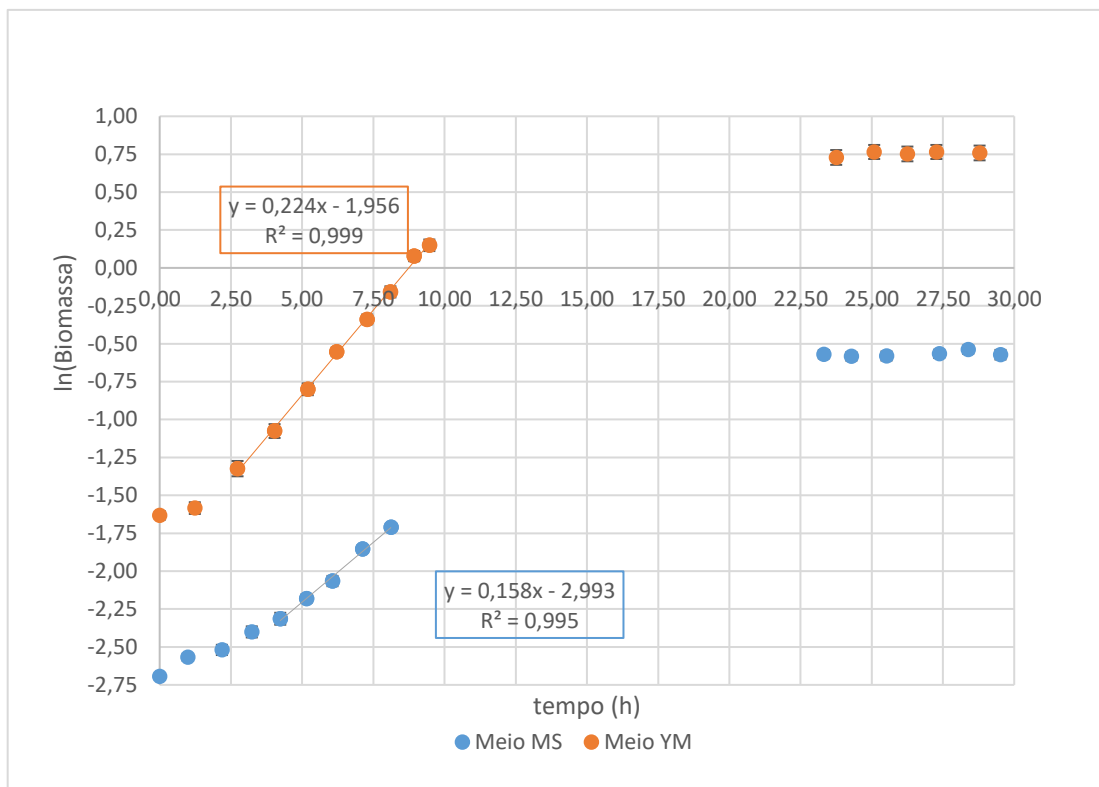
meio MS não houve tanto crescimento, por se tratar de um meio menos rico, o açúcar consumido foi usado para manutenção celular não tendo havido tanto crescimento. No meio YM, por ser um meio mais rico por conter peptona, que atua como substrato, e extrato de malte na sua composição, a manutenção celular foi feita utilizando os nutrientes existentes no meio, portanto, o consumo de glucose neste meio, foi mais dirigido para o seu crescimento celular, resultando em maiores quantidades de biomassa.

Neste gráfico também se pode observar a redução de pH de 7,22 para 4,85 para o meio MS e de 5,21 para 4,39 para o meio YM, como era esperado. Quando a *S. cerevisiae* se encontra em condições aeróbicas ocorre crescimento celular, o que implica que haverá consumo de O<sub>2</sub> e liberação de CO<sub>2</sub> e água. Este CO<sub>2</sub> ao entrar em equilíbrio produz iões de H<sup>+</sup> segundo a equação 9:



Assim, em ambos os meios temos a diminuição do pH e, portanto, a acidificação do meio de crescimento.

Representou-se ainda o logaritmo da biomassa *vs* tempo de fermentação de modo a visualizar as fases de crescimento celular da levedura, como se pode ver na figura 4.9:



**Figura 4.9** – Representação logarítmica da biomassa (g/L) vs tempo para o meio MS e para o meio YM

A fase lag no meio YM aparenta ter a duração de aproximadamente 1h enquanto que no meio MS aparenta iniciar-se logo o seu crescimento. Após a fase lag, no meio YM existe um crescimento muito mais acentuado do que no meio MS, obtendo-se uma taxa específica de crescimento de  $0,233 \text{ h}^{-1}$  para o meio YM e de  $0,158 \text{ h}^{-1}$  para o meio MS. O final da fase exponencial, bem como o início da fase estacionária decorreram durante a noite, não havendo assim registo das mesmas. É possível observar que entre as 22h30min e as 30h de fermentação ainda decorria a fase estacionária. A comparação dos valores obtidos encontra-se na Tabela 4.1.

**Tabela 4.1** – Comparação dos parâmetros cinéticos e estequiométricos nos meios MS e YM

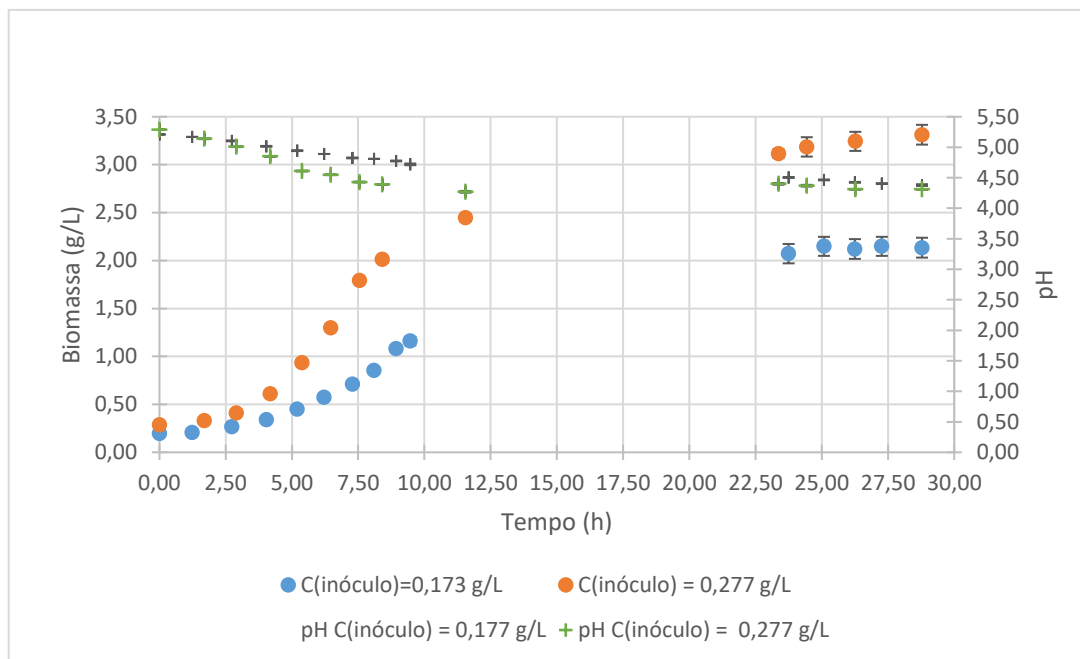
Meio	$\mu_{\text{máx}} (\text{h}^{-1})$	CFU's para t=25h	Biomassa máxima (g/L)	$S_c (\text{g/L})$	$Y_{x/S_c} (\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$	$P_x (\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1})$
MS	0,158	6,50E+09	0,58	18,1	0,032	0,017
YM	0,224	2,03E+10	2,15	19,5	0,110	0,044

A taxa específica de crescimento da levedura é superior no meio YM como referido acima e observado na tabela e é também notável a diferença entre a quantidade de biomassa máxima, sendo a obtida para o meio YM bastante superior. Foram realizados CFU's para  $t=25h$  e, como se pode observar na tabela, utilizando o meio YM obteve-se um número muito maior de células viáveis do que utilizando o meio MS. O consumo de substrato, neste caso, de glucose, foi também superior no meio YM, resultando num maior rendimento e numa produtividade celular superior relativamente ao meio MS.

Tendo em conta estes resultados, todos os ensaios seguintes foram realizados utilizando o meio YM líquido. Este meio proporcionou melhores resultados a todos os níveis, obtendo-se uma taxa específica de crescimento superior, uma concentração de biomassa final maior, uma maior produtividade e rendimento.

#### **4.2.3. Influência da Concentração Inicial de Inóculo**

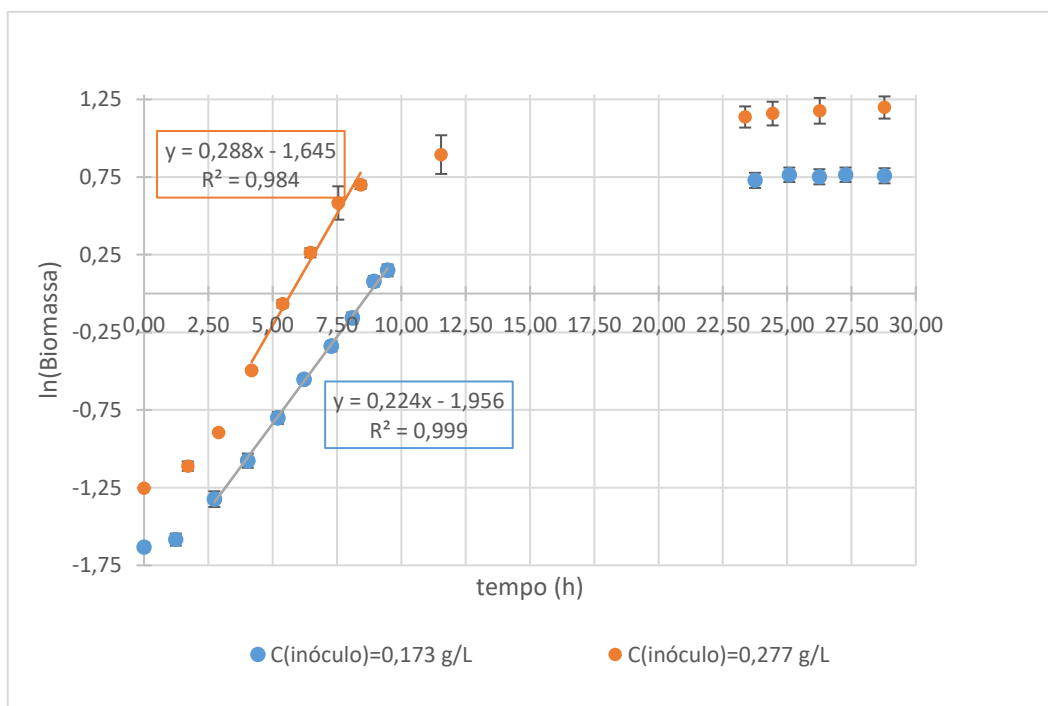
Para estudar a influência da concentração inicial de inóculo nos ensaios foi realizado um ensaio semelhante utilizando o meio YM, mas com uma concentração inicial de inóculo superior. O primeiro ensaio em meio YM foi realizado com densidade ótica inicial de 0,500, a que corresponde uma concentração de 0,173 g/L. Este segundo ensaio com o meio YM iniciou-se com uma densidade ótica de 0,800, ou seja, uma concentração de biomassa de 0,277 g/L. Procedendo-se do mesmo modo que nos ensaios anteriores, foram retirados os dados necessários para comparação da concentração de biomassa vs tempo de fermentação, que se encontram descritos na Figura 4.10.



**Figura 4.10** - Comparação da concentração de biomassa vs tempo para uma concentração de inóculo de 0,173 g/L e de 0,277 g/L e monitorização do pH durante a fermentação.

Como se pode observar, iniciando os ensaios com uma concentração de inóculo superior, obteve-se uma concentração de biomassa máxima superior de 3,19 g/L. Verifica-se também que, iniciando o ensaio com maior concentração de inóculo, houve um arranque mais rápido e maior. Entra as 12h30min e as 22h30min de fermentação, a fase exponencial termina e inicia-se a fase estacionária. O pH diminui nos dois ensaios, iniciando com 5,21 e terminando com 4,39 para o ensaio com menor concentração de inóculo e iniciando com 5,29 e terminando com 4,31 para o ensaio com 0,277 g/L de concentração de inóculo.

Também se representou em escala logarítmica a densidade ótica medida durante os ensaios, apresentada na Figura 4.11.



**Figura 4.11** – Representação logarítmica da biomassa vs tempo para uma concentração de inóculo de 0,173 g/L e 0,277 g/L

Como é possível observar no gráfico, a fase lag no ensaio com concentração de inóculo 0,173 g/L é de cerca de 1h, enquanto que no ensaio com concentração de inóculo de 0,277 g/L aparenta ter menos de uma hora. Também se pode verificar que o crescimento na fase exponencial é maior no ensaio com concentração de inóculo de 0,277 g/L, obtendo-se uma taxa específica de crescimento de  $0,288 \text{ h}^{-1}$ , enquanto que para o ensaio com concentração de inóculo de 0,173 g/L obteve-se uma taxa específica de crescimento de  $0,233 \text{ g/L}$ . Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 4.2.

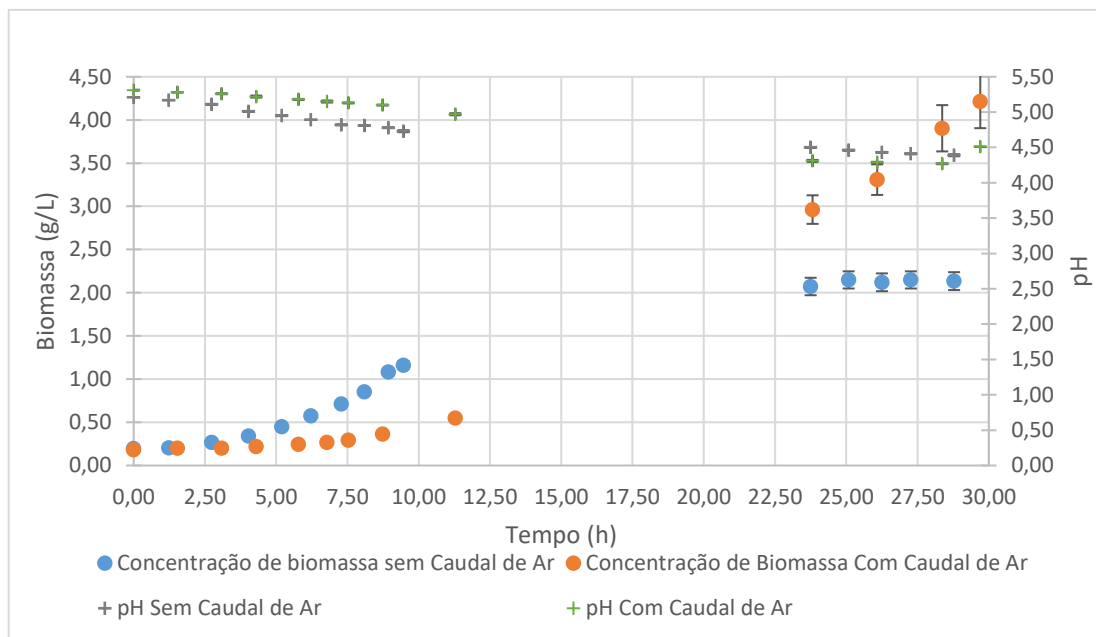
**Tabela 4.2** – Comparação dos parâmetros cinéticos para uma concentração de inóculo de 0,173 g/L e de 0,277 g/L

Ensaio	$\mu_{\text{máx}} (\text{h}^{-1})$	CFU's para t=25h	Biomassa máxima (g/L)
<b>C<sub>inóculo</sub> = 0,173 g/L</b>	0,224	2,03E+10	2,15
<b>C<sub>inóculo</sub> = 0,277 g/L</b>	0,288	5,14E+09	3,19

Como se pode observar na Tabela 4.2, ao iniciar o ensaio com maior concentração de inóculo obtém-se melhores resultados. Apesar de que nos CFU's os resultados indicam que existe uma maior concentração de células vivas no ensaio iniciado com menor concentração de inóculo de 0,173 g/L, deve ter havido algum problema aquando da realização dos CFU's.

#### **4.2.4. Influência do Arejamento**

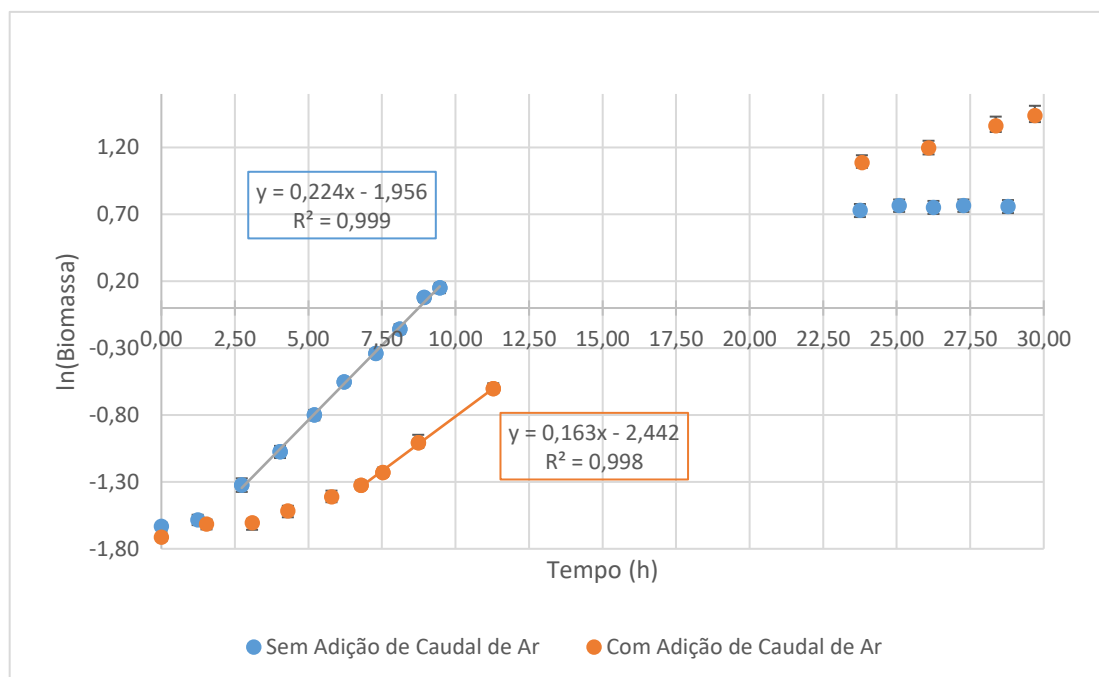
Tendo em conta que um ambiente com condições aeróbicas favorece o crescimento de microrganismos como as leveduras, optou-se por adicionar um caudal de ar de 2 L/min durante as fermentações. Realizou-se por um ensaio com a menor concentração de inóculo estudada, 0,173 g/L correspondente a uma densidade ótica de 0,5 realizado nas mesmas condições de temperatura e agitação que os ensaios anteriores, mas com a adição de um caudal de ar. Fez-se a comparação dos dados obtidos neste ensaio com os dados obtidos do ensaio realizado com meio YM e concentração de inóculo 0,173 g/L, mas sem adição de caudal de ar. Os perfis de concentração de biomassa encontram-se representados na Figura 4.12.



**Figura 4.12** – Estudo do efeito da adição de um caudal de ar de 2 L/min na biomassa durante a fermentação e monitorização do pH.

Como se pode observar, quando se forneceu um caudal de ar o arranque da fermentação foi mais lento, isto pode ser devido à tensão de corte causada pela entrada do caudal de ar, no entanto, terminou-se o ensaio com maior concentração de biomassa quando se tem fornecimento de ar. Apesar de à priori o observado ser um melhor resultado, a diferença entre a quantidade de biomassa final, quando houve fornecimento de oxigénio, foi um valor muito mais elevado, não se tendo detetado fase estacionária, o que se tornava incoerente com os ensaios anteriores onde a fase estacionária se iniciou provavelmente por falta de substrato. Representou-se em escala logarítmica as biomassas obtidas de modo a diferenciar melhor as fases de crescimento, esta representação é observada na Figura 4.13.





**Figura 4.13** – Representação logarítmica da biomassa vs tempo comparando a influência da adição de um caudal de ar de 2 L/min.

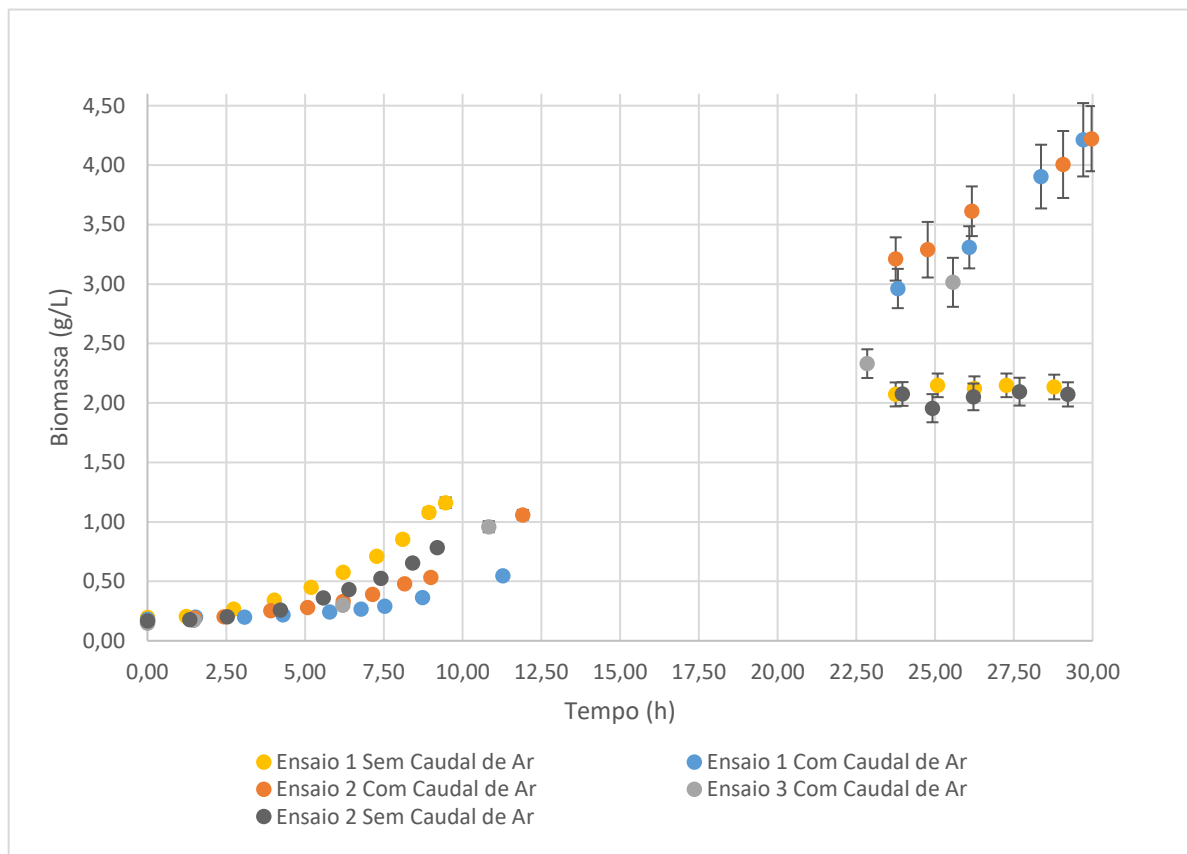
Na Figura 4.13 é possível observar que sem adição de ar a fase lag teve duração de aproximadamente 1h e quando houve adição de ar, a fase lag tem duração de cerca de 3h. É visível uma grande diferença entre as fases de crescimento exponencial, quando não houve adição de ar, com taxa específica de crescimento de  $0,224 \text{ h}^{-1}$ , mais elevada do que quando houve adição de ar, com taxa específica de crescimento de  $0,163 \text{ h}^{-1}$ . Também nesta representação gráfica não se verifica a fase estacionária do ensaio com adição de ar. Os dados obtidos são representados na Tabela 4.3.

**Tabela 4.3** - Comparação dos parâmetros cinéticos sob a influência da adição de um caudal de ar.

Ensaio	$\mu_{\text{máx}} (\text{h}^{-1})$	CFU para t=25h	Biomassa máxima (g/L)
Sem adição de caudal de ar	0,224	2,03E+10	2,15
Com adição de caudal de ar	0,163	2,12E+10	4,21

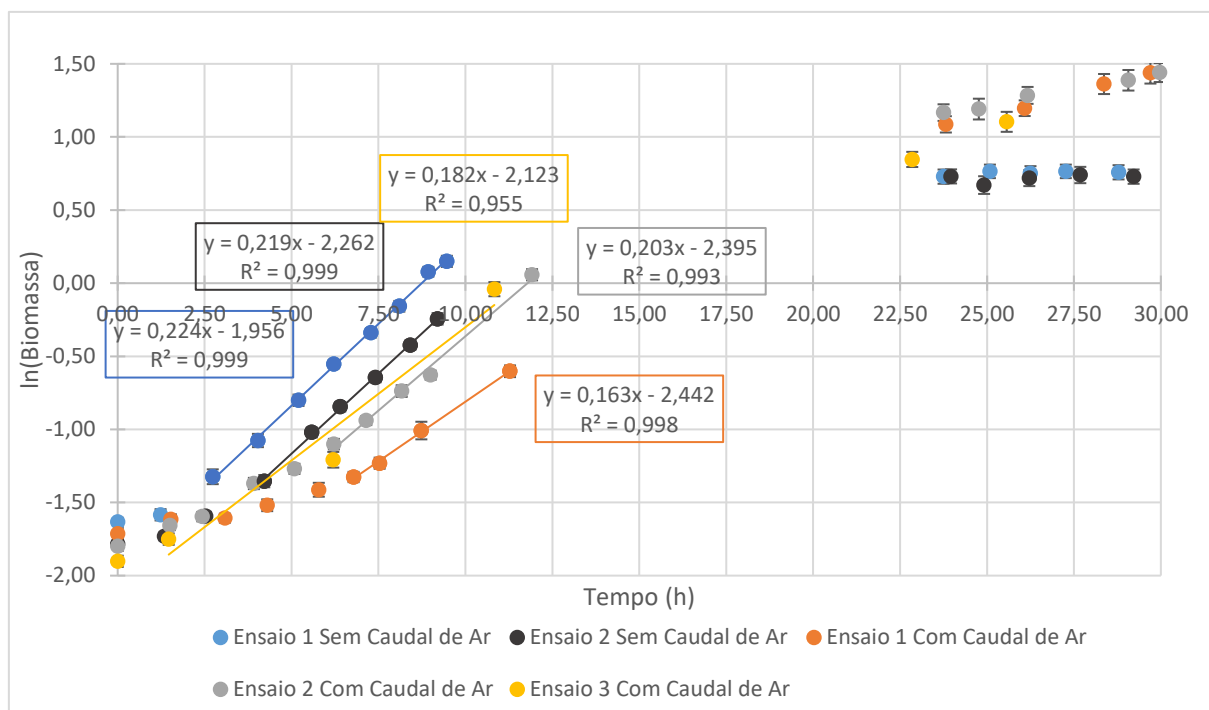
A concentração de biomassa final obtida no ensaio com ar foi de aproximadamente o dobro da obtida para o ensaio sem ar. Para validar

ou não estes resultados, foram feitas réplicas dos ensaios com e sem a adição de ar e os resultados dos perfis das concentrações de biomassa estão representados na Figura 4.14.



**Figura 4.14** – Estudo da influência da adição de um caudal de ar de 2 L/min na fermentação e a sua reprodutibilidade

Observando a Figura 4.14 pode dizer-se que os resultados são reprodutíveis, apesar de que existe maior oscilação nos resultados obtidos nos ensaios com fornecimento de ar. Os ensaios com fornecimento de caudal de ar repetiram-se recolhendo menos amostras no início do ensaio de forma a ter amostra suficiente para seguir o final da fermentação. Porém isto não foi possível, visto que existia uma grande evaporação com redução de volume de fermentação ao fornecer o caudal de ar. Foram também representados em escala logarítmica as biomassas obtidas nos ensaios para melhor comparação das fases de crescimento, apresentados na Figura 4.15.



**Figura 4.15** – Representação logarítmica da biomassa vs tempo das réplicas dos para o estudo da influência da adição de um caudal de ar de 2 L/min.

Assim como foi referido acima, existe uma maior diferença quando se observam os ensaios em que há fornecimento de um caudal de ar. Os restantes resultados encontram-se representados na Tabela 4.4.

**Tabela 4.4** – Comparação dos parâmetros cinéticos sob a influência da adição de um caudal de ar de 2 L/min e a sua reprodutibilidade

Ensaio	$\mu_{\text{máx}} \text{ (h}^{-1}\text{)}$	CFU's para $t \approx 25\text{h}$	Biomassa máxima (g/L)
Ensaio 1 sem adição de caudal de ar	0,224	2,03E+10	2,15
Ensaio 2 sem adição de caudal de ar	0,219	4,66E+09	2,10
Ensaio 1 com adição de caudal de ar	0,163	2,12E+10	4,21
Ensaio 2 com adição de caudal de ar	0,203	3,24E+10	4,22
Ensaio 3 com adição de caudal de ar	0,182	2,95E+10	3,02

As taxas específicas de crescimento para os ensaios sem fornecimento de ar foram semelhantes,  $0,224 \text{ h}^{-1}$  para o primeiro ensaio e  $0,219 \text{ h}^{-1}$  para o segundo ensaio. Quando se forneceu o caudal de ar, existe uma maior diferença sendo os valores de taxa específica de crescimento  $0,163 \text{ h}^{-1}$ ,  $0,203 \text{ h}^{-1}$  e  $0,182 \text{ h}^{-1}$ , todos estes inferiores aos

valores obtidos sem fornecimento de caudal de ar. Quando se observam os resultados das concentrações de biomassa final, os valores obtidos nos ensaios com fornecimento de caudal de ar (4,214 g/L, 4,223 g/L, e 3,015 g/L) são superiores aos obtidos nos ensaios sem o fornecimento deste caudal (2,148 g/L e 2,095 g/L). A concentração de biomassa final foi praticamente o dobro quando se forneceu o caudal de ar, com exceção da obtida no ensaio 3 com fornecimento de caudal de ar, mas note-se que, este ensaio foi mais curto do que os restantes. Todos os ensaios foram feitos até  $t \approx 30h$ , mas, neste último ensaio apenas foi possível seguir a fermentação até às 25h30min devido à elevada evaporação do volume de fermentação, sendo que o valor da biomassa máxima correspondeu ao valor obtido neste ponto. Tendo em conta que o comportamento das leveduras neste ensaio deveria ser semelhante ao comportamento dos outros ensaios nas mesmas condições, é possível afirmar que este deveria atingir uma concentração de biomassa máxima semelhante aos restantes ensaios.

Foram também realizados CFU's nestes ensaios para  $t \approx 25h$  que demonstram que a concentração de células vivas é semelhante em qualquer ensaio, sendo este realizado com ou sem fornecimento de caudal de ar. Houve apenas a exceção do ensaio 2 sem fornecimento de ar, onde a concentração de células vivas obtida foi de uma ordem de grandeza menor, do que a de todos os restantes ensaios, o que indica que poderá ter ocorrido algum tipo de erro durante esta contagem ou durante o manuseamento destas placas.

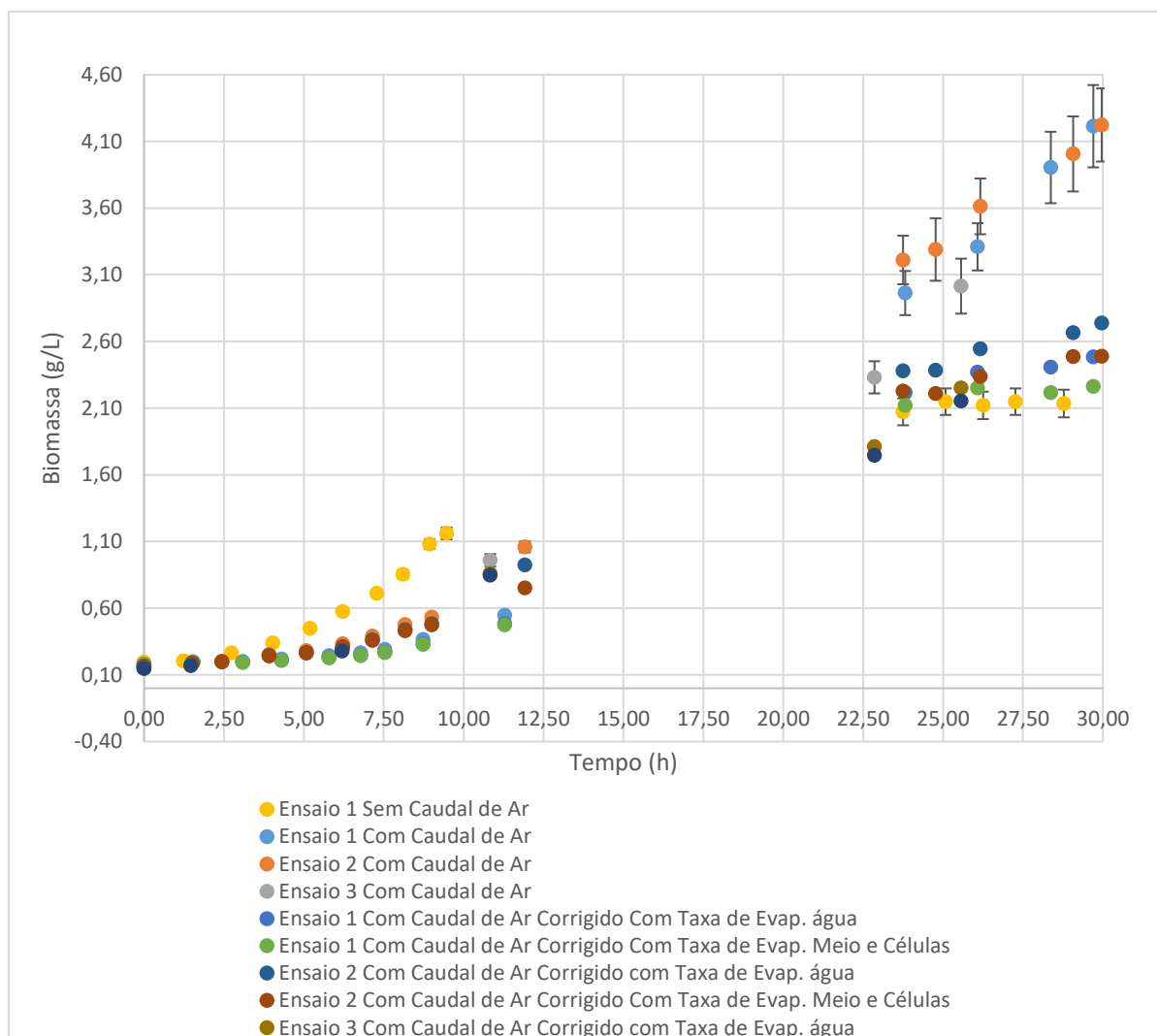
Estes valores, apesar de reprodutíveis deixam margem de dúvida, durante a reprodução dos ensaios com o fornecimento de ar pois foi notória uma grande evaporação do meio de fermentação. Foi então calculada uma taxa de evaporação da amostra durante a experiência com fornecimento de ar. Foi feito

um ensaio branco, apenas com água destilada e um ensaio com meio de crescimento e leveduras. Nestes ensaios retiraram-se amostras às mesmas horas que nos ensaios estudados de modo a que houvesse a mesma diferença de volume final. Os resultados obtidos encontram-se representados na Tabela 4.5.

**Tabela 4.5** – Comparação dos volumes de fermentação e taxas de evaporação calculadas.

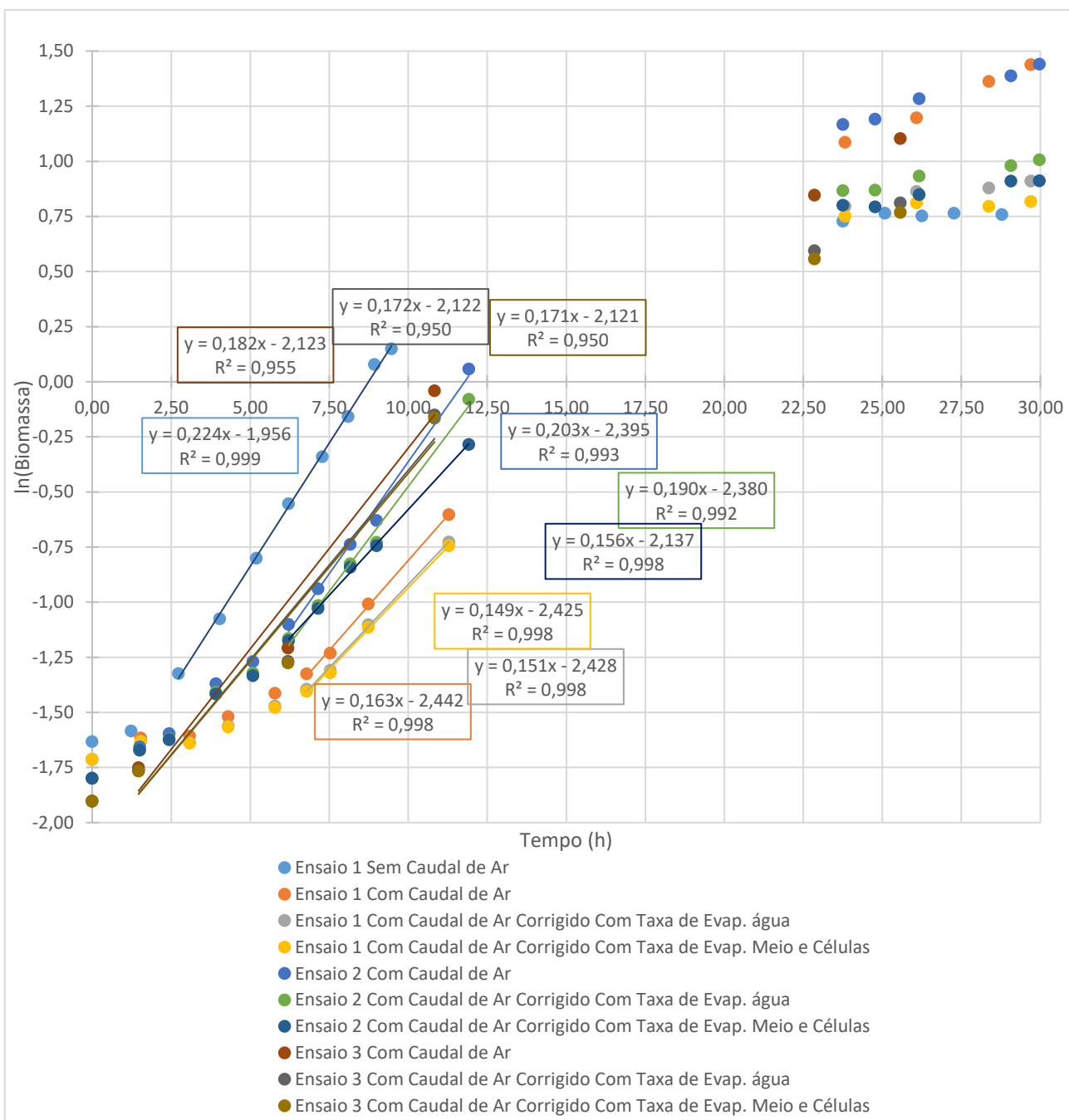
	<b>V<sub>inicial</sub> (mL)</b>	<b>V<sub>final teórico</sub> (mL)</b>	<b>V<sub>final real</sub> (mL)</b>	<b>V<sub>evaporado</sub> (mL)</b>	<b>tempo (h)</b>	<b>Taxa de Evaporação (mL/h)</b>
<b>Ensaio com água</b>	200	143,5	50	93,5	51,05	1,83
<b>Ensaio com cultura</b>	200	138,5	22,5	116	56,18	2,06

No ensaio em branco foi obtido um valor de 1,83 mL/h de taxa de evaporação e para o ensaio com meio e leveduras um valor de 2,06 mL/h. O ensaio feito com água destilada mostra que o fornecimento de um caudal de ar foi o suficiente para ter havido evaporação e redução do volume. Isto poderá ser explicado devido ao aumento de pressão no Erlenmeyer pois o fluxo de entrada do ar no Erlenmeyer era mais rápido obrigando também o de saída a ser assim, de modo a manter-se a pressão normal. A taxa de evaporação obtida num ensaio com meio e leveduras foi superior à obtida no ensaio branco, o que demonstra que a atividade das leveduras quando houve crescimento, também teve influência na evaporação do meio. Isto pode ser explicado devido à libertação de CO<sub>2</sub> durante o crescimento e ao aumento da temperatura o que causou um maior aumento de pressão no Erlenmeyer, resultando numa maior taxa de evaporação. Com os valores obtidos foram feitas correções nos valores das experiências realizadas com fornecimento de ar. Os resultados estão explícitos no gráfico da Figura 4.16.



**Figura 4.16** – Efeito da evaporação causada pela adição de um caudal de ar de 2 L/min.

Como é possível observar, na Figura 4.16 as curvas de crescimento tornam-se mais coerentes ao serem corrigidas com as taxas de evaporação. Os valores de concentração de biomassa máximos aparentam continuar a ser superiores relativamente ao ensaio sem fornecimento do caudal de ar. O crescimento quando há fornecimento de um caudal de ar continua a ser mais lento. De seguida, na Figura 4.17 fez-se a representação gráfica dos logaritmos das biomassas obtidas de modo a observar melhor as fases de crescimento e a calcular as taxas específicas de crescimento.



**Figura 4.17** – Representação logarítmica da biomassa vs tempo para os ensaios realizados com a adição de um caudal de ar e as suas correções com as taxas de evaporação calculadas. Cálculo das taxas específicas de crescimento.

É de notar que a taxa específica de crescimento máxima diminui ligeiramente com esta correção, isto é, o crescimento da cultura aparenta ser mais lento. A comparação de valores com as correções é feita na Tabela 4.6.

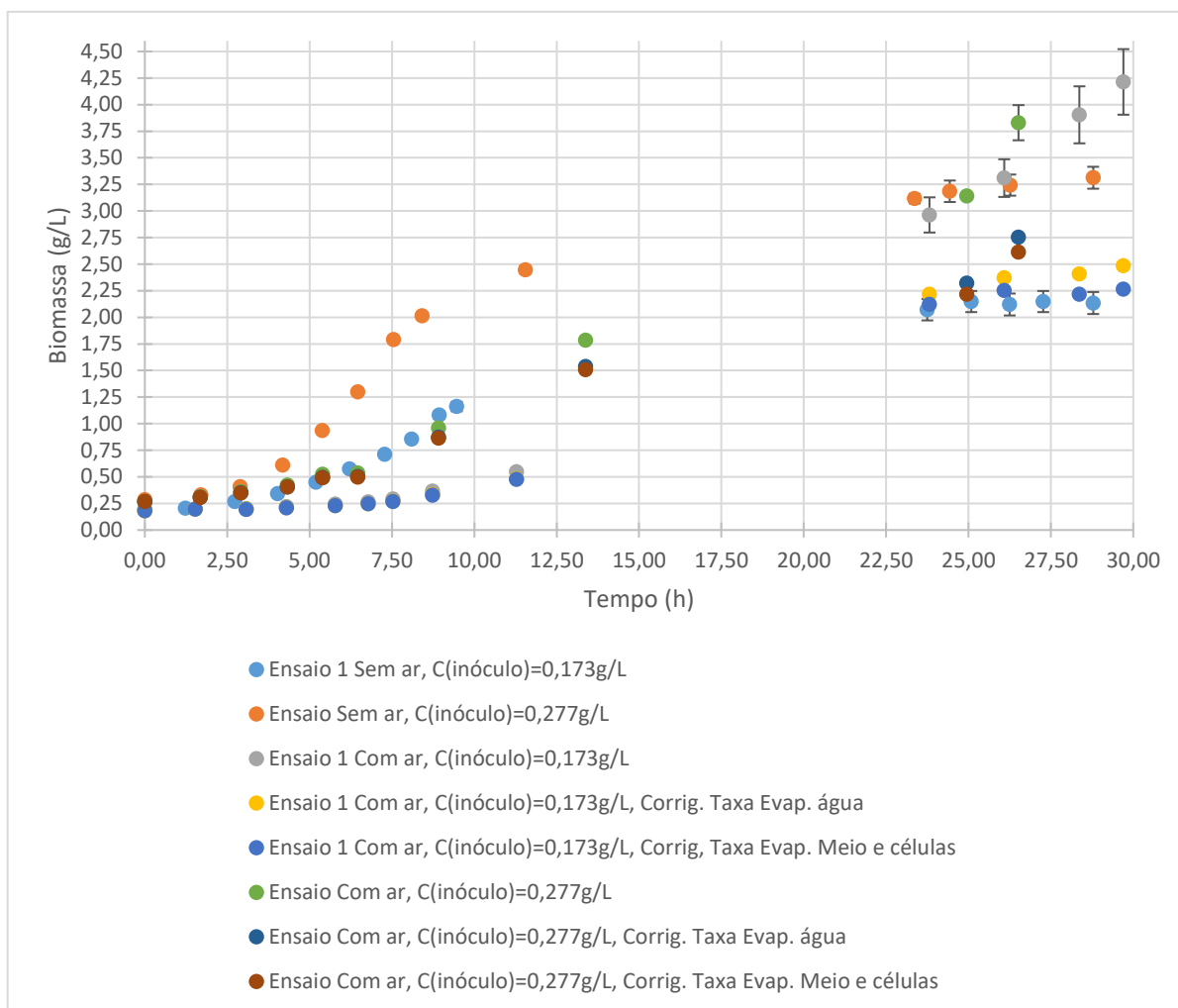
**Tabela 4.6** – Efeito da evaporação causada pela adição de um caudal de ar nos parâmetros cinéticos

Ensaio	$\mu_{\text{máx}}$ (h <sup>-1</sup> )	Biomassa máxima (g/L)	Correções com taxa de evaporação de água		Correções com taxa de evaporação de cultura	
			$\mu_{\text{máx}}$ (h <sup>-1</sup> )	Biomassa máxima (g/L)	$\mu_{\text{máx}}$ (h <sup>-1</sup> )	Biomassa máxima (g/L)
Ensaio 1 sem adição de caudal de ar	0,224	2,15	-	-	-	-
Ensaio 1 com adição de caudal de ar	0,163	4,21	0,151	2,48	0,149	2,26
Ensaio 2 com adição de caudal de ar	0,203	4,22	0,190	2,74	0,156	2,49
Ensaio 3 Com adição de caudal de ar	0,182	3,02	0,172	2,25	0,171	2,15

Como se pode observar na Tabela 4.6, as taxas específicas de crescimento diminuem quando são corrigidas, havendo uma maior diferença entre estas e quando não houve adição de ar no ensaio. A biomassa máxima, também diminui com as correções das taxas de evaporação, mas continuam a ser ligeiramente superiores do que a obtida no ensaio sem a adição de ar.

Também foi realizado um ensaio com adição de ar, mas com a maior concentração de inóculo estudada, de 0,277 g/L. O perfil de concentração de biomassa ao longo do tempo, juntamente com os perfis dos restantes ensaios com ou sem adição de ar e com diferentes concentrações de inóculo foram representados na Figura 4.18.

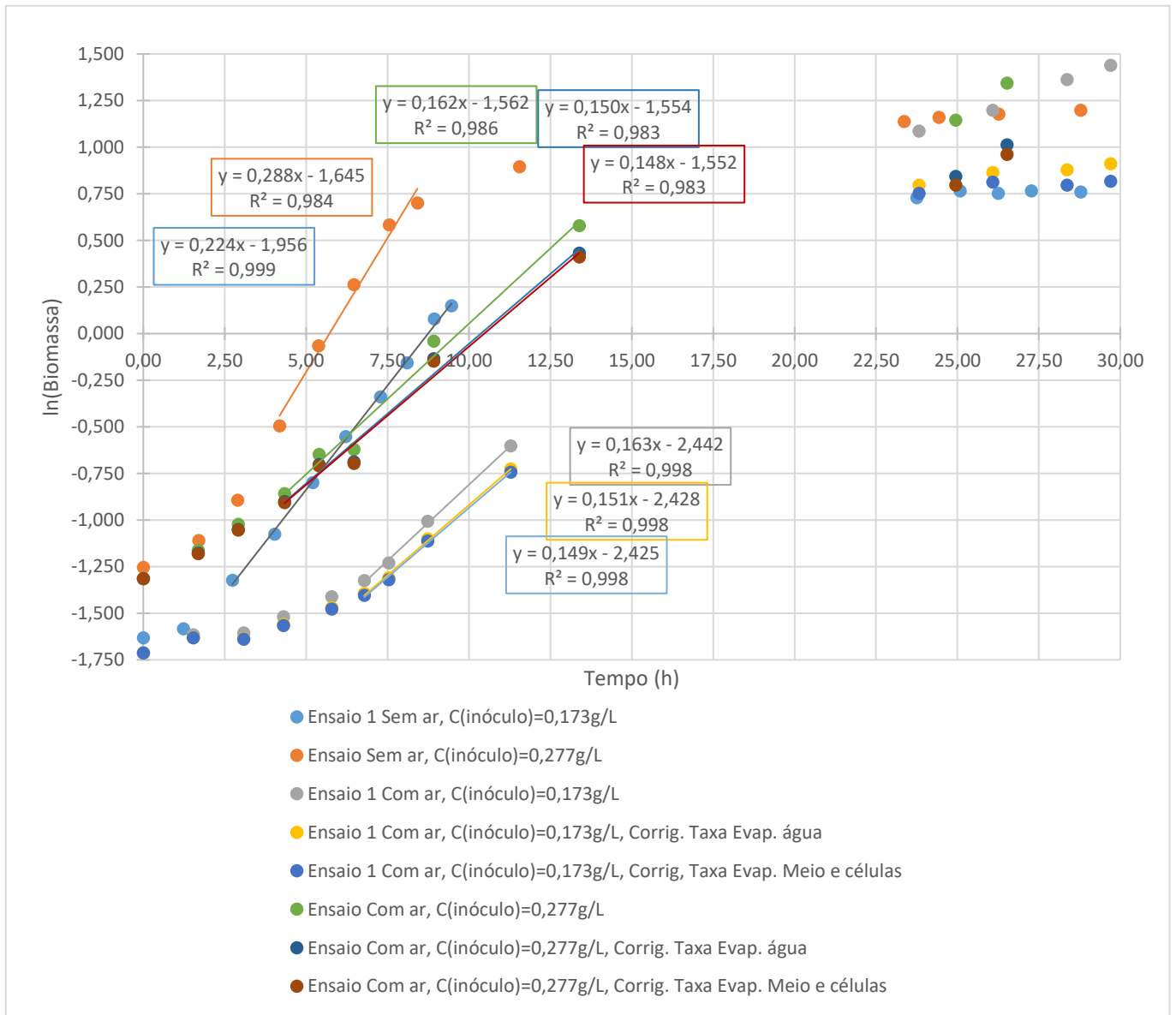




**Figura 4.18.** – Compara\u00e7\u00e3o das curvas de crescimento para  $C_{in\acute{o}culo}=0,173$  g/L e  $C_{in\acute{o}culo}=0,277$  g/L com e sem a adi\u00e7\u00e3o de um caudal de ar de 2 L/min.

Neste \u00faltimo ensaio com  $C_{in\acute{o}culo}=0,277$  g/L, o crescimento da biomassa mostrou o mesmo comportamento do que nos ensaios realizados com  $C_{in\acute{o}culo}=0,173$  g/L. Foram feitas tamb\u00e9m as corre\u00e7\u00f5es com as taxas de evapora\u00e7\u00e3o, tamb\u00e9m representadas na Figura 4.18. Na realiza\u00e7\u00e3o deste \u00faltimo ensaio houve maior aumento de press\u00e3o o que fez com que a rolha do Erlenmeyer saltasse, o que resultou na paragem da fermenta\u00e7\u00e3o, pois uma vez exposto ao ar, n\u00e3o havia garantias que n\u00e3o tivesse ocorrido contamina\u00e7\u00e3o. Neste ensaio houve uma maior evapora\u00e7\u00e3o e os dados obtidos, mesmo com as corre\u00e7\u00f5es das taxas de evapora\u00e7\u00e3o n\u00e3o permitem observar a fase estacion\u00e1ria. Foram ent\u00e3o

representados os resultados obtidos em escala logarítmica na  
Figura 4.19.



**Figura 4.19** – Representação logarítmica dos perfis de biomassa vs tempo para  $C_{inóculo}=0,173$  g/L e  $C_{inóculo}=0,277$  g/L com e sem a adição de um caudal de ar de 2 L/min. Representação das respetivas correções das taxas de evaporação calculadas.

Como se pode observar no gráfico da Figura 4.19, a fase estacionária não é detetável para o ensaio com ar e  $C_{inóculo}=0,173$  g/L, mesmo após a correção com as taxas de evaporação. A taxa específica de crescimento deste ensaio foi menor do que nos

ensaios sem arejamento, apresentando valores semelhantes aos valores obtidos no ensaio com arejamento e  $C_{\text{inóculo}}=0,173 \text{ g/L}$ . Estes valores estão apresentados na Tabela 4.7.

**Tabela 4.7** – Comparação dos parâmetros cinéticos dos ensaios com diferentes concentrações de inóculo, com e sem arejamento e as suas correções com as taxas de evaporação calculadas

Ensaio	$\mu_{\text{máx}}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	Biomassa máxima ( $\text{g/L}$ )	Correções com taxa de evaporação de água		Correções com taxa de evaporação meio e células	
			$\mu_{\text{máx}}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	Biomassa máxima ( $\text{g/L}$ )	$\mu_{\text{máx}}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	Biomassa máxima ( $\text{g/L}$ )
Ensaio 1, $C_{\text{inóculo}}=0,173\text{g/L}$ , sem adição de caudal de ar	0,224	2,15	-	-	-	-
Ensaio 2, $C_{\text{inóculo}}=0,173\text{g/L}$ , sem adição de caudal de ar	0,219	2,10	-	-	-	-
Ensaio, $C_{\text{inóculo}}=0,277\text{g/L}$ , sem adição de caudal de ar	0,288	3,19	-	-	-	-
Ensaio 1, $C_{\text{inóculo}}=0,173\text{g/L}$ , com adição de caudal de ar	0,163	4,21	0,151	2,48	0,149	2,26
Ensaio 2, $C_{\text{inóculo}}=0,173\text{g/L}$ , com adição de caudal de ar	0,203	4,22	0,190	2,74	0,156	2,49
Ensaio 3, $C_{\text{inóculo}}=0,173\text{g/L}$ , com adição de caudal de ar	0,182	3,02	0,172	2,25	0,171	2,15
Ensaio, $C_{\text{inóculo}}=0,277\text{g/L}$ , com adição de caudal de ar	0,162	3,83	0,150	2,75	0,148	2,62

Como se pode observar, os valores das taxas específicas de crescimento mostram um crescimento mais lento quando se adicionou ar à fermentação. Relativamente à biomassa máxima obtida no ensaio com adição de ar e  $C_{\text{inóculo}}=0,277 \text{ g/L}$ , nada se pode concluir, visto que este ensaio teve fim em  $t \approx 25\text{h}30\text{min}$ , o que implica que o seu crescimento poderia continuar e o valor da biomassa máxima poderia ultrapassar o valor obtido para a mesma concentração de inóculo sem adição de ar. Às condições permitidas, os melhores resultados foram obtidos sem adição de um caudal de ar com  $C_{\text{inóculo}}=0,277 \text{ g/L}$ . De qualquer forma, os resultados mostram que a adição de um caudal de ar seria algo a implementar em maior escala, de modo a que a tensão de corte causada pela entrada do ar não tivesse interferência no crescimento das leveduras.



## **5. Conclusões**

Com os primeiros ensaios em Erlenmeyer, utilizando os meios sintéticos YM e MS verifica-se que no ensaio utilizando meio YM obteve-se um valor superior de taxa específica de crescimento de  $0,224 \text{ h}^{-1}$  e também um valor de biomassa final superior de  $2,15 \text{ g/L}$ . O consumo da glucose ocorreu totalmente nos dois meios, mas, no meio MS o crescimento celular foi inferior, pois, por se tratar de um meio menos rico, o açúcar consumido foi usado para manutenção celular não tendo havido tanto crescimento. No meio YM, por ser um meio mais rico, a manutenção celular foi feita utilizando os nutrientes existentes no meio, portanto, o consumo de glucose neste meio, foi mais dirigido para o seu crescimento celular, resultando em maiores quantidades de biomassa.

Testaram-se duas concentrações de inóculo, tendo-se comparado uma  $C_{\text{inóculo}}=0,173 \text{ g/L}$  (correspondente a uma  $D.O_{\text{inicial}}=0,500$ ), com uma concentração superior de  $C_{\text{inóculo}}=0,277 \text{ g/L}$ , correspondente a uma  $D.O_{\text{inicial}}=0,800$ . Comparando os resultados obtidos verificou-se que se obteve uma taxa específica de crescimento superior de  $0,288 \text{ h}^{-1}$  nos ensaios iniciados com  $C_{\text{inóculo}}=0,277 \text{ g/L}$ , bem como uma concentração de biomassa máxima superior de  $3,19 \text{ g/L}$ . Verificou-se assim que utilizar uma concentração de inóculo superior, correspondente a  $D.O_{\text{inicial}}=0,800$  é mais benéfico.

Testou-se a adição de um caudal de ar fornecido ao Erlenmeyer durante a fermentação de modo a verificar a influência de fornecimento de oxigénio no crescimento das leveduras. Estes ensaios foram também realizados com uma  $C_{\text{inóculo}}=0,173 \text{ g/L}$  e com uma  $C_{\text{inóculo}}=0,277 \text{ g/L}$ . Neste tipo de ensaios verificou-se uma grande taxa de evaporação do volume de fermentação devido ao fluxo de entrada do ar no Erlenmeyer. A taxa de evaporação obtida num ensaio com meio e leveduras foi superior à obtida no ensaio branco, o que demonstrou que a atividade das leveduras quando houve crescimento, também teve influência na

evaporação do meio devido à libertação de  $\text{CO}_2$  durante o seu crescimento. Após as correções aos valores obtidos nos ensaios com ar, verificou-se que o crescimento se tornou mais lento quando houve adição de ar o que pode ser explicado pela tensão de corte da entrada do ar no Erlenmeyer. Os valores de biomassa máxima foram superiores com a adição de ar quando se iniciou os ensaios com  $C_{\text{inóculo}}=0,173 \text{ g/L}$ . Quando se iniciou o ensaio com  $C_{\text{inóculo}}=0,277 \text{ g/L}$  não foi possível retirar conclusões da biomassa máxima obtida quando houve adição de ar pois este terminou 4h30min antes dos restantes ensaios, não sendo possível detetar a sua fase estacionária.

Nas condições testadas, os melhores resultados foram obtidos sem adição de um caudal de ar, com  $C_{\text{inóculo}}=0,277 \text{ g/L}$ . De qualquer forma, os resultados mostram que a adição de um caudal de ar seria algo a implementar em maior escala, de modo a que a tensão de corte causada pela entrada do ar não tivesse interferência no crescimento das leveduras. Sugere-se então que os ensaios possam prosseguir num estudo em biorreator em maior escala com  $C_{\text{inóculo}}=0,277 \text{ g/L}$  e com meio de cultura YM.

## 6. Bibliografia

- [1] F. Rebello, “Produção de Cerveja,” *Revista Agrogeoambiental*, pp. 145–155, 2009.
- [2] E. Pires and T. Brányik, *Biochemistry of Beer Fermentation*. New York: Springer, 2015.
- [3] C. Bamforth, *Beer: Tap Into the Art and Science of Brewing*, 2nd ed. New York: Oxford University Press, 2003.
- [4] D. K. Parker, “Beer: Production, sensory characteristics and sensory analysis,” *Alcohol. Beverages Sens. Eval. Consum. Res.*, pp. 133–158, 2012.
- [5] J. J. Palmer, *How to Brew: Everything You Need To Know To Brew Beer Right The First Time*, 3rd ed. United States of America: Ray Daniels, 2006.
- [6] “Malteurop.” [Online]. Available: <https://pt.malteurop.com/os-nossos-dominios/maltes/maltagem>. [Accessed: 20-Aug-2018].
- [7] W. S. Kroger, *Brewing Science and Practice*, vol. 130, no. 8. 1973.
- [8] C. Almaguer, C. Schönberger, M. Gastl, E. K. Arendt, and T. Becker, “Humulus lupulus - a story that begs to be told. A review,” *J. Inst. Brew.*, vol. 120, no. 4, pp. 289–314, 2014.
- [9] C. Boulton and D. Quain, *Brewing Yeast and Fermentation*, 1st ed. Paris: Blacwell Science, 2001.
- [10] B. Steenackers, L. De Cooman, and D. De Vos, “Chemical transformations of characteristic hop secondary metabolites in relation to beer properties and the brewing process: A review,” *Food Chem.*, vol. 172, pp. 742–756, 2015.
- [11] T. Praet, F. Van Opstaele, B. Jaskula-Goiris, G. Aerts, and L. De Cooman, “Biotransformations of hop-derived aroma compounds by *Saccharomyces cerevisiae* upon fermentation,” *Cerevisia*, vol. 36, no. 4, pp. 125–132, 2012.
- [12] E. J. Pires, J. A. Teixeira, T. Brányik, and A. A. Vicente, “Yeast: The soul of beer’s aroma - A review of flavour-active esters and

- higher alcohols produced by the brewing yeast,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 98, no. 5, pp. 1937–1949, 2014.
- [13] M. J. Lewis and T. W. Young, *Brewing*, 1st ed. London: Chapman & Hall, 1996.
  - [14] S. Hieronymus, *For the Love of Hops: The Practical Guide to Aroma, Bitterness and the Culture of Hops*, 1st ed., vol. 24, no. 2. Colorado: Brewers Publications, 2012.
  - [15] “Super Bock.” [Online]. Available: <http://superbock.pt/pt/pt/processo-produtivo/#enchimento-e-pasteurizacao>. [Accessed: 20-Jul-2018].
  - [16] L. M. Prescott, D. A. Klein, and J. P. Harley, *Microbiology*. 2008.
  - [17] M. Malajovich, “Um Microrganismo Industrial - Exigências Nutritivas da Levedura,” 2009.
  - [18] F. Rodrigues, P. Ludovico, and C. Leão, “Sugar Metabolism in Yeasts: an Overview of Aerobic and Anaerobic Glucose Catabolism,” in *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*, pp. 101–121.
  - [19] F. Alcântara, M. Â. Cunha, and M. A. Almeida, *Microbiologia: práticas laboratoriais*, 1ª edição. Aveiro: Universidade: Universidade de Aveiro, 1996.
  - [20] N. Lima and M. Mota, *Biotechnologia*, 1ª edição. Lisboa: Lidel, 2003.
  - [21] J. A. Teixeira and M. M. Fonseca, *Reactores Biológicos: Fundamentos e Aplicações*. Portugal: Lidel - Edições Técnicas, Lda, 2007.